

А.А. ЗАВАРЗИН  
А.Д. ХАРАЗОВА  
М.Н. МОЛИТВИН

# БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

ОБЩАЯ  
ЦИТОЛОГИЯ



ИЗДАТЕЛЬСТВО  
С.-ПЕТЕРБУРГСКОГО  
УНИВЕРСИТЕТА



А. А. ЗАВАРЗИН, А. Д. ХАРАЗОВА,  
М. Н. МОЛИТВИН

# БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ: ОБЩАЯ ЦИТОЛОГИЯ

*Рекомендовано Комитетом по высшей школе  
Министерства науки, высшей школы и  
технической политики России в качестве  
учебника для студентов биологических спе-  
циальностей высших учебных заведений.*



САНКТ-ПЕТЕРБУРГ  
ИЗДАТЕЛЬСТВО С.-ПЕТЕРБУРГСКОГО УНИВЕРСИТЕТА  
1992

Рецензенты: Кафедра общей биологии с генетикой (зав. кафедрой С.-Петербургского педиатрического медицинского ин-та д-р биол. наук *С. Н. Оленев*), канд. биол. наук *А. А. Добровольский* (С.-Петербургский государственный ун-т).

Печатается по постановлению  
Редакционно-издательского совета  
С.-Петербургского университета

УДК 03.00.17

Заварзин А. А., Харазова А. Д., Молитвин М. Н.  
**БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ: ОБЩАЯ ЦИТОЛОГИЯ:**

Учебник. — СПб.: Изд-во С.-Петербургского ун-та,  
1992. 320 с.

ISBN 5-288-00851-5.

В учебнике излагаются основы синтетической науки — биологии клетки. На высоком теоретическом уровне, требующем знания основ генетики, частной цитологии, структурной биохимии, освещается современное состояние общецитологических проблем. Широко используя сравнительный материал, авторы выводят общие закономерности организации клетки во всем многообразии их проявления у разных объектов.

Учебник предназначен для студентов-биологов, преподавателей, научных работников. Библиогр. 55 назв. Ил. 111.

1903030000—125  
3  $\frac{076(02)—92}{116—92}$

Учебное издание

*Заварзин Алексей Алексеевич, Харазова Александра Давидовна,*

*Молитвин Михаил Николаевич*

**Биология клетки: Общая цитология**

Учебник

Редактор *Т. Н. Пескова*

Художественный редактор

Технический редактор *А. В. Борщева*

Корректоры *В. А. Латыгина, А. С. Качинская*

ИБ № 3727

Сдано в набор 09.04.92. Подписано в печать 29.09.92. Формат 60×90<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Бумага тип. № 2. Гарнитура литературная. Печать высокая. Усл. печ. л. 20. Усл. кр.-отт. 21,56. Уч.-изд. л. 21,37. Тираж 2132 экз. Заказ № 140.

Издательство С.-Петербургского университета. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9.

Типография Изд-ва С.-Петербургского университета. 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9.

ISBN 5-288-00851-5

© Издательство С.-Петербургского  
университета, 1992  
© А. А. Заварзин,  
А. Д. Харазова,  
М. Н. Молитвин,  
1992

Отфигуровано: Юрий Каретин, 2018  
Yuriy Karetn, yura15cbxa@gmail.com  
https://www.facebook.com/yuriy.karetn



## ПРЕДИСЛОВИЕ

В настоящее время во многих университетах страны чтение курса цитологии осуществляется в первые годы обучения, перед курсами гистологии, биохимии, генетики и микробиологии, что предусмотрено и в типовых программах. Более того, существует обыкновение, на наш взгляд весьма архаичное, объединять этот курс с гистологией, рассматривая его как введение в биологию. На наш взгляд, это отражает непонимание тех сдвигов в структуре биологии, которые произошли в последнее время. Существующая традиция резко снижает значение этого курса в общебиологическом образовании и не соответствует реальному положению общей цитологии в современной науке.

Университетское общее образование широкого профиля складывается из четырех логически связанных между собой циклов наук. Первый из них, включающий зоологию, ботанику, анатомию человека, микробиологию с вирусологией и некоторые другие, знакомит студента с разнообразием форм живого. Без знания этого не может быть настоящего биолога. Второй цикл (сравнительная гистология, физиология, эмбриология, биохимия, общая генетика) показывает в этом многообразии наличие определенных системных закономерностей организации, функционирования и эволюции живых систем. Третий цикл (общая цитология, молекулярная биология и молекулярная генетика, биофизика) знакомит студентов с фундаментальными принципами организации живой материи. Наконец, завершать общую подготовку биолога должен цикл глубоких курсов о проблемах эволюции биосистем и общей экологии.

При такой, исторически обусловленной и апробированной системе университетской подготовки биологов широкого профиля, курсу цитологии отводится роль итогового, суммирующего представления студентов о клеточном уровне организации живой материи, полученные при освоении предметов первых двух циклов.

Естественно, что этот курс должен быть отнесен на пятый, а еще лучше на шестой семестр, после завершения студентами прохождения двух первых циклов общеобразовательной подготовки.

Кроме того, читаться этот курс должен на современном уровне состояния общецитологических проблем, не дублируя уже известные студентам элементарные сведения об организации различных клеток.

Опыт такой постановки курса общей цитологии имеется в Санкт-Петербургском госуниверситете, где он читается в шестом семестре и вызывает большой интерес у студентов-старшекурсников.

Настоящий учебник ориентирован на такое положение курса общей цитологии, которое, как нам кажется, наилучшим образом отражает ее роль в современной науке.

Существующие отечественные и переводные учебники либо ориентированы на студентов младших курсов, либо устарели в связи с бурным развитием общей цитологии. Кроме того, в центре внимания учебников и учебных пособий обычно оказываются скорее проблемы молекулярной биологии, структурной биохимии и молекулярной генетики, нежели общей цитологии. Так, в учебной литературе относительно слабо освещены вопросы, посвященные рассмотрению поверхностного аппарата клетки как одной из ее основных субсистем, равноценной по значению ядру или цитоплазме. Совершенно не достаточно подчеркивается важность и успехи сравнительно-цитологических исследований как одного из наиболее перспективных направлений в общей цитологии. Незаслуженно принижены, по нашему мнению, роль и значение общей цитологии в синтетической науке — биологии клетки.

Удачный (судя по читательским откликам) опыт создания учебного пособия по цитологии был предпринят нами в 1982 г. (А. А. Заварзин, А. Д. Харазова «Основы общей цитологии»). Однако за истекшие годы почти по всем разделам общей цитологии появилось много новых данных, существенно углубивших и даже изменивших наши представления о закономерностях организации клеток. Естественно, с учетом непрерывного совершенствования читаемых на кафедре лекций, мы ввели существенные коррективы и в фактическую, и в теоретическую части книги, значительно расширив ее объем. В итоге получилось новое учебное пособие, в котором, на наш взгляд, в полной мере сохранены и даже усилены отмеченные выше положительные особенности. Учитывая возросшую сложность работы и обилие материала, мы сочли возможным расширить авторский коллектив, введя в него ассистента кафедры кандидата биологических наук М. Н. Молитвина, который принимал участие и в создании предыдущей книги.

Предлагаемое читателям издание представляет собой учеб-



ник повышенной сложности. Хотя оно готовилось для студентов третьего курса, но безусловно может быть использовано и преподавателями, и специалистами широкого круга дисциплин как краткая сводка состояния общецитологических проблем в настоящее время. Естественно при этом, что достаточно глубоко и всесторонне осветить разнообразные вопросы, не работая непосредственно во всех областях общей цитологии, — задача довольно сложная. Поэтому неизбежны просчеты и ошибки, за указание на которые авторы заранее благодарят читателей. Частично избежать ошибок мы пытались, консультируясь со специалистами, за что приносим искреннюю благодарность М. П. Баранову, И. А. Воробьеву, Е. Р. Гагинской, Ю. В. Гамалею, В. П. Гончаровой, А. А. Добровольскому, С. А. Карпову, Е. Г. Краснодембскому, А. А. Мюльбергу, Г. П. Пинаеву, А. В. Пиневичу, Л. Н. Серавину, Е. Г. Скворцевичу, В. Е. Стефанову, А. В. Родионову.

Основная тяжесть по подготовке рукописи легла на плечи Т. Г. Шапошниковой; большую работу по оформлению рукописи провели также З. А. Зайченко, Е. И. Лихарева, Т. В. Серговская, В. Ф. Синицина. Большинство рисунков выполнено М. Н. Молитвиным; в подготовке иллюстративного материала также принимали участие М. Ю. Пунин и И. В. Соловей. Всем им авторы приносят глубокую благодарность.

## ИСТОРИЯ И МЕТОДОЛОГИЯ ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 1.1. ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ ЦИТОЛОГИИ

Цитология как самостоятельная наука возникла в середине XIX столетия с формулировки одного из крупных обобщений биологии — клеточной теории. Однако можно считать, что своими корнями цитология уходит в XVII в., поскольку изображения растительных клеток, вернее оболочек мертвых клеток, были получены Р. Гуком еще в 1665 г. Более систематические микроскопические исследования на высших растениях проводили М. Мальпиги (1671—1675), Н. Грю (1671) и А. Левенгук (1674), который первым наблюдал клетки животных (эритроциты, сперматозоиды) и одноклеточные организмы.

Однако от первых описаний клеток до формулировки клеточной теории прошло более полутора веков — период более длительный, чем вся современная история развития цитологии (с 1839 г. по настоящее время).

Столь медленные темпы развития науки о клетке в период ее предыстории объяснялись несовершенством первых микроскопов и отсутствием специальных методов подготовки биологических объектов к микроскопическим исследованиям.

Значительное усовершенствование методов микроскопического исследования (создание ахроматических микроскопов) произошло в начале XIX в. В 30-е гг. прошлого столетия благодаря трудам многих ученых уже укрепилось представление о растительной клетке как элементарной структуре растений, что нашло отображение в обобщающих монографиях и учебниках того времени (П. Тюрпе «Элементарная и сравнительная микроскопическая органография растений», 1829 г., Ф. Мейени «Фитотомия», 1830 г. и др.).

В 30-е гг. XIX в. Р. Броуном в растительных клетках были обнаружены ядра. Затем было показано их наличие в клетках всех организмов. В этом плане особое значение имели исследования, проведенные чешским ученым Я. Пуркинью и сотруд-



никами берлинской лаборатории И. Мюллера. Появлению клеточной теории предшествовала работа немецкого ботаника М. Шлейдена «Материалы к фитогенезу». Исходя из понятия о клетке как основной структурной единице растений Шлейден ставит вопрос о способе образования новых клеток, но решает его неверно, предполагая развитие клеток из бесструктурного вещества, путем конденсации которого формируются ядра будущих клеток.

Несмотря на ложность этой концепции, идея существенного значения ядра для организации клеток растений оказала большое влияние на ученика И. Мюллера Т. Шванна, изучавшего хорду и хрящи позвоночных животных. Он обнаружил глубокую аналогию в элементарных структурах, образующих эти ткани, и сформулировал идею об общности строения животных и растений и универсальности их клеточной организации. Эти идеи, как результаты предварительных исследований, были опубликованы Т. Шванном в 1838—1839 гг., а в развернутом виде появились в его книге «Микроскопические исследования» в 1839 г., который и считается годом создания клеточной теории и возникновения цитологии как самостоятельной науки об общих закономерностях строения клеток — универсальных элементарных единиц организации живой материи.

Уже в первой формулировке этой теории содержалось два важных положения — о единстве происхождения жизни и об общих принципах организации живой материи, а следовательно, и общих принципах ее эволюции.

На первых этапах развития клеточной теории происходило освобождение ее от ряда ошибочных положений: одно из них заключалось в недооценке роли цитоплазмы и некоторой переоценке значения клеточной стенки для образования растительных клеток. Преодолеть этот недостаток помогли цитологи, изучавшие клетки животных. Их представления о весьма важной роли цитоплазмы в организации клеток были позднее признаны и ботаниками.

В этот же период (середина XIX в.) происходит интенсивная разработка проблемы образования клеток — теория Шлейдена и Шванна подвергается все более сокрушительной критике. В 40-х гг. появилась целая серия исследований, в которых (на разных объектах — растительных и животных) было убедительно показано, что новообразование клеток происходит путем их деления: «Каждая клетка от клетки» — так подытожил эти исследования в 1855 г. немецкий патолог Р. Вирхов.

Значительно позднее, в 70-х гг. прошлого столетия, благодаря усовершенствованию гистологической техники и в результате работы целой плеяды ученых у самых разных объектов были обнаружены хромосомы, описано не прямое клеточное деление и начаты исследования процессов деления одноклеточных организмов. К концу XIX в. относятся открытие общих и специальных

органонидов в цитоплазме, а также попытки создать теорию ее структурной организации.

Наряду с углублением представлений об организации и жизнедеятельности клеток важное значение в развитии общей цитологии имело внедрение учения о клеточной организации в биологию и медицину. Важными вехами на этом пути стали целлюлярная патология Р. Вирхова, целлюлярная физиология М. Ферворна и учение И. И. Мечникова о фагоцитах — теории, послужившие основой развития современной медицины и иммунологии. Существенную роль учение о клеточном строении живого сыграло и в развитии эмбриологии. Наконец, оно дало возможность систематизировать и перевести на научную основу сравнительно-зоологические и ботанические исследования, проводимые на одноклеточных организмах, что в свою очередь позволило приступить к созданию научной филогенетической систематики и тем самым способствовало торжеству эволюционного учения. В свою очередь сравнительно-цитологические исследования обогащали и учение о клеточной организации живой материи. Они позволяли выявлять универсальные закономерности организации живого во всем многообразии их модификаций у разных метазойных клеток и одноклеточных организмов.

В начале XX в. наиболее существенным шагом в развитии общей цитологии стало ее объединение с новой зарождающейся наукой — генетикой, и возникновение важного раздела этой науки — цитогенетики. Характерной чертой и, вероятно, необходимым условием развития общей цитологии в этот период было ее «поглощение» другими науками. Одной из причин такого положения явилось, по-видимому, следующее: возможности усовершенствования микроскопов и микроскопической техники к этому времени были уже в значительной мере исчерпаны; в цитологических работах, проводимых специалистами смежных наук, начали широко использоваться специальные методы прижизненных исследований.

Результаты этих работ, а также успехи коллоидной химии породили скептическое отношение к возможностям анализа тонкой химической организации клеточных структур на мертвых, фиксированных и окрашенных препаратах. Все это привело к кризису в развитии общей цитологии как самостоятельной науки об общих закономерностях организации клеток. В цитологии начали преобладать «узкие» специальные исследования. Они были направлены либо на выяснение специфических особенностей организации клеток тех или иных объектов (в гистологии, зоологии, ботанике), либо на решение конкретных задач, стоящих перед определенной областью биологии (генетикой, физиологией, медициной).\*

\* Весьма характерным признаком такого положения в системе биологических наук было то обстоятельство, что самостоятельный курс общей цито-



Выход из кризиса и возрождение общей цитологии как самостоятельной науки начался лишь в эпоху научно-технической революции, во второй половине XX в. Решающее значение имели здесь усилия биохимиков и цитологов, которые объединились для выяснения функционального значения субклеточных структур с помощью исследования их тонкой химической организации. Такой комплексный подход оказался возможным лишь тогда, когда морфологи разработали методы, позволившие перейти к анализу структур на надмолекулярном уровне организации, а биохимики так усовершенствовали свои методы, что появилась возможность связать биохимические процессы с определенными клеточными структурами.

Объединению усилий морфологов и биохимиков способствовала разработка и таких «пограничных» методов, как авторадиография (особенно на электронно-микроскопическом уровне), гибридизация нуклеиновых кислот, иммуноцитохимия, цитохимия ферментов и многие другие. Благодаря комплексному подходу к анализу субклеточных структур выяснение их функционального значения перешло на качественно новый уровень. Сейчас во многих случаях удалось ответить на вопрос, какие биохимические механизмы лежат в основе функционирования клеточных структур. В качестве примеров такого рода работ можно привести исследования окислительного фосфорилирования в митохондриях, анализ механохимических систем поперечно-полосатых мышц, исследование процессов биосинтеза белка в клетках и его внутриклеточного транспорта. Во всех этих работах, начавших новый этап цитологических исследований, функциональное значение клеточных структур выяснялось путем анализа их химической организации. При этом удалось установить, что основной специфической характеристикой биохимических процессов, происходящих в живых клетках, является их структурированность. Она обеспечивается строгой пространственной организацией мультиэнзимных комплексов, компартментализацией клетки на ряд специализированных отсеков и, наконец, примембранной локализацией важнейших ферментативных систем. Большинство ключевых биохимических реакций в клетках имеет векторный характер.

Эти принципиально новые представления об организации клетки наряду с успехами молекулярной биологии в области изучения нуклеиновых кислот, процессов матричного синтеза и механизмов синтеза белка создали основу для возрождения общей цитологии как самостоятельной науки и для возникновения новой синтетической науки — биологии клетки.

---

логии читался только в двух университетах мира — в Кембриджском университете (профессором Э. Вильсоном) и в Петроградском (профессором А. С. Догелем).

## 1.2. МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ СОВРЕМЕННОЙ ЦИТОЛОГИИ

На современном этапе развития цитологии существуют два подхода к изучению общих закономерностей организации и эволюции клеток — дискретный и интегративный.

В эпоху научно-технической революции наибольшими успехами и интенсивным развитием характеризуется дискретный подход, поскольку большинство современных методов нацелено на детальное исследование химической организации субклеточных структур. При этом не всегда удается провести четкую грань между структурно-биохимическими и цитологическими исследованиями, поскольку интересы цитологов и биохимиков часто совпадают. Правда, классические методы структурной биохимии основаны на разрушении клеток и получении в дальнейшем отдельных фракций исследуемых субклеточных структур с помощью дифференциального центрифугирования. «Классические» цитологические методы предполагают максимально возможное сохранение нативных субклеточных структур и локализацию в них конкретных химических соединений с помощью цитохимии и авторадиографии.

У каждого подхода в классическом исходном варианте есть и достоинства, и недостатки. Так, биохимики имеют возможность использовать мощный аппарат качественного и количественного анализа, однако им далеко не всегда удается выделять «чистые» фракции исследуемых структур, особенно при работе с гетерогенными клеточными системами. Для снятия подобных ограничений цитологические и биохимические подходы приходится сочетать в одном исследовании, а также специально разрабатывать пограничные методы, такие как гибридизация нуклеиновых кислот на срезах или иммуноцитохимия с применением моноклональных антител на электронно-микроскопическом уровне. По мере углубления наших знаний о химической природе субклеточных структур при дискретном подходе не всегда удается провести четкую грань между исследованиями биохимиков и молекулярных биологов, с одной стороны, и цитологов — с другой. Обычно считается, что первые занимаются молекулярным и надмолекулярным уровнями организации, а вторые — субсистемным и органоидным. Естественно, такое подразделение весьма условно. Так, структурно-химическую организацию рибосом изучают в основном специалисты в области молекулярной биологии, а АТФ-синтазные комплексы во внутренней мембране митохондрий впервые были описаны цитологами.

Помимо структурно-химического анализа в современной цитологии существенную роль играют экспериментально-физиологические методы исследования. Они весьма многообразны. Обширную область здесь составляют работы на модельных объектах, таких как культуры эукариотных клеток. При этом воз-



можно получение однородного клеточного материала в больших количествах, что весьма важно для биохимических исследований. Кроме того, на клеточных культурах можно изучать воздействие химических и физических агентов на отдельные субклеточные системы и клетки в целом, используя методы современного структурно-химического анализа, что дополняет исследование функционального значения субклеточных структур в нормальных условиях.

На культурах клеток разработан также комплекс специальных методов, в том числе гибридизация соматических клеток и образование гетерокарионов клеток филогенетически отдаленных организмов и др. Подобные экспериментальные методы, позволяющие манипулировать с такими клеточными системами, как ядро и цитоплазма, делают возможными не только дискретный, но и интегративный подход к исследованию общих закономерностей клеточной организации. Особенно большое значение для развития интегративного подхода в современной цитологии играют непрерывно расширяющиеся сравнительно-цитологические исследования.

Они развиваются в трех взаимно дополняющих друг друга направлениях. Суть первого из них заключается в выборе из большого многообразия метазойных клеток и клеток одноклеточных организмов объекта, удобного для решения данной проблемы. Идейной основой такого подхода являются представления о тождестве (универсализме) основных субклеточных структур, что наиболее ярко отражено в концепции универсальных блоков. Суть ее заключается в том, что ныне существующие клетки претерпели длительную эволюцию еще в период становления одноклеточных организмов. В это время и были найдены, использованы и доведены до совершенства все ключевые механизмы и «узлы» клеточной организации. У современных организмов (и многоклеточных, и одноклеточных) эволюция клеток идет в основном путем комбинаторики давно возникших консервативных универсальных функциональных блоков. С этих позиций, особенно при дискретном анализе естественно использовать те объекты (клетки), где таких блоков особенно много, они интенсивно функционируют и есть возможность их выделить методами дифференциального центрифугирования. Именно такой подход и был широко распространен на первых этапах современного периода развития цитологии. Результатом этого явилось детальное исследование довольно широкого, но все же ограниченного круга объектов, например культивируемых *in vitro* фибробластов (для анализа организации цитоскелета), нервных клеток в культурах (как в период гистогенеза, так и дефинитивных — для исследования механизмов внутриклеточного транспорта), всасывающих клеток кишечного эпителия и клеток нефронов почки млекопитающих (для анализа принципов организации транспорта в асимметричных клетках). Этот подход



достаточно широко применяется и в настоящее время и, вероятно, не потеряет своего значения в будущем, особенно при дискретном анализе организации эукариотных клеток.

Второе направление сравнительно-цитологических исследований связано с использованием сравнительного метода по принципу гомологии — подхода, традиционного для эволюционной морфологии. Этот подход преследует следующие цели: уточнить естественную систему одноклеточных организмов, выявить их истинные филогенетические отношения и путем сопоставления примитивных древних клеточных систем с более совершенными понять принципы эволюционного усложнения клеток.

Если первое направление сравнительно-цитологических исследований носит скорее частноцитологический характер, то второе имеет прямое отношение к общебиологическим проблемам. Обычно при такого рода сопоставлениях признавалось прокариотное происхождение эукариотных клеток и, следовательно, признаки организации эукариотных клеток, сходные с прокариотными, рассматривались как примитивные. Примером такого подхода может служить создание многочисленных схем эволюции митоза, согласно которым участие ядерной оболочки в расхождении хромосом рассматривается как признак, первоначально унаследованный эукариотами от прокариотных клеток. С этих же позиций оценивается наличие у некоторых низших эукариот кольцевых молекул ДНК, отсутствие гистонов и цикла спирализации и деспирализации хромосом. В конечном счете результатами такого сравнительного подхода в современной цитологии являются широко распространенные теории симбиотического происхождения митохондрий и хлоропластов.

Наконец, третье и наиболее важное, на наш взгляд, направление сравнительных исследований в общей цитологии — это применение сравнительного метода по принципу функциональной аналогии. Теоретической основой такого подхода является идея о существовании внутренних закономерностей эволюции живой материи в рамках клеточной организации при наличии жестких ограничений на субклеточном и молекулярном уровнях. Изменения в эволюции далеко не во всех случаях сводятся к перекомбинации сходных или идентичных функциональных блоков в разных клетках. Более того, идентичность этих блоков скорее исключение, чем правило, поскольку эволюционируют целостные интегрированные клетки, а не отдельные их компоненты. Естественно при этом, что в разных клетках вполне возможно ожидать наличия значительных и нетождественных модификаций функционально аналогичных субклеточных структур. А следовательно, изучение наиболее существенных модификаций играет важнейшую роль в выяснении общебиологического значения этих структур и в понимании основных принципов их структурно-химической организации.

Таким образом, этот подход свободен от недостатка, прису-



щего первому направлению сравнительно-цитологических исследований, отрицающему возможность существенных модификаций на низших субклеточных уровнях организации.

Следует еще раз подчеркнуть, что в основе применения сравнительного метода по принципу функциональной аналогии лежит именно признание факта эволюционных изменений целостной клетки как интегрированной системы, а не свободной комбинации отдельных функциональных блоков.

По мере расширения круга объектов, изучаемых методами цитологического и молекулярно-биологического анализа, становится очевидным, что прежние представления о филогенетических отношениях между одноклеточными организмами были весьма поверхностными; кроме того, безоговорочно принятая схема о прокариотном происхождении эукариотных клеток оказывается несостоятельной. Сейчас практически общепризнанна идея о длительной параллельной эволюции по крайней мере трех типов клеток-организмов — предшественников зубактерий, архебактерий и эукариот. В связи с этим далеко не все их сходные черты являются результатом общности происхождения, ряд признаков и структур могли возникнуть независимо на сходной основе в результате параллельной эволюции в составе разных целостных клеток.

Такая логика рассуждений может быть применена и при сопоставлении некоторых современных протистов и метазойной клетки — находя у них общие признаки организации, вряд ли можно безоговорочно утверждать, что эти признаки отражают непосредственное родство этих клеток и были выработаны в эволюции в период преобладания одноклеточного уровня организации. Вполне возможно, что сходные признаки могли независимо появиться в результате направленных эволюционных изменений этих клеток в связи с выполнением сходных функциональных задач на какой-то общей основе и далеко не в тождественной форме. Во всяком случае сравнительный анализ в таком виде получает все большее применение в современной клеточной биологии при исследовании органоидного и высших надмолекулярных уровней организации.

Имеются попытки серьезной ревизии общепринятых представлений о молекулярной эволюции на уровне нуклеиновых кислот и отдельных белков: безоговорочность оценки степени родства по количеству совпадений последовательностей нуклеотидов или аминокислотных остатков сейчас сомнительна.

Обнаружены, например, функционально сходные, но не гомологичные белки бактериородопсин и родопсин фоторецепторов. С другой стороны, в ряде случаев показано, что совпадение последовательности аминокислотных остатков функционально сходных белков далеко не всегда отражает действительное родство организмов, поскольку это постоянство может поддерживаться и параллельными, и возвратными мутациями. Многочис-

ленные примеры весьма специфических функционально аналогичных белков у прокариот и метазойных клеток, что трудно объяснить с позиций гомологии.

Одной из попыток разрешить это противоречие является представление о возможности естественного горизонтального переноса генетической информации от прокариотных клеток к эукариотным. В крайнем выражении эти теоретические взгляды допускают известное «разделение труда» между эукариотными и прокариотными организмами. Последние таким путем непрерывно пополняют общий генетический фонд биосферы. В эукариотных геномах новая генетическая информация обрабатывается при естественном отборе с участием внутриклеточных регуляторных механизмов.

Несмотря на известную фантастичность такого рода рассуждений, на возможности искусственного горизонтального переноса генетической информации основана вся современная биотехнология и генная инженерия. Рациональным зерном в этих рассуждениях является, на наш взгляд, и представление о пластичности генома, которое хорошо согласуется с современными данными о его нестабильности. Обилие существующих на современном этапе развития биологии взаимоисключающих представлений об эволюционной динамике клеток и субклеточных структур свидетельствует о бурном прогрессе в этой области знаний. По-видимому, в каждой из рассмотренных выше гипотез и каждом методологическом подходе к сравнительно-цитологическим исследованиям имеется рациональное зерно. В будущей синтетической теории эволюции клеток найдут свое отражение положительные стороны этих концепций. Однако нам кажется, что на современном этапе развития биологии наиболее плодотворным будет представление о многообразии функционально аналогичных субклеточных структур, обусловленном их изменениями в эволюции в составе разных целостных интегрированных систем. В пользу справедливости такого рода представлений говорят, например, результаты сравнения рибосом архебактерий, эубактерий, пластид, митохондрий и цитоплазмы эукариот; геномов митохондрий животных клеток и грибов; начатое в настоящее время интенсивное изучение эволюционной динамики важнейших белковых семейств и многое другое. Помимо максимального использования возможностей сравнительного метода большим достоинством его применения по принципу функциональной аналогии является еще и акцентирование внимания на представлении о клетке как элементарной целостной системе живой материи — а это наиболее специфический для общей цитологии (как самостоятельной науки) подход к проблеме исследования общих закономерностей организации и эволюции клеток.



### 1.3. МЕСТО ОБЩЕЙ ЦИТОЛОГИИ В СИСТЕМЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

Как отмечалось выше, общая цитология неразрывно связана со многими смежными науками: методы исследования в общей цитологии и науках, изучающих конкретные клетки, одни и те же. Различия состоят лишь в аспектах исследования: в частной цитологии внимание сосредоточено на специфических особенностях клеток, а при общецитологическом подходе на том, как в этих специфических особенностях проявляются общие закономерности клеточной организации. Естественно при этом, что общая цитология получает от частных наук богатый материал, очень важный для многоплановых сравнительных исследований, в свою очередь обогащая эти науки общебиологическими идеями.

Не менее тесная связь обнаруживается, с одной стороны, между цитологией, физиологией и биофизикой и, с другой стороны, между цитологией и науками медицинского профиля, особенно иммуноморфологией и онкологией. Для общей цитологии контакт с этими науками необходим как для расширения круга модельных объектов, так и для совершенствования методов исследования. Наконец, экспериментальная физиология часто ставит интересные вопросы, решение которых требует структурно-химического анализа. Для перечисленных наук общая цитология является фундаментальной дисциплиной, владеющей современными представлениями об общих закономерностях клеточной организации. Очевидно, что без знания этих закономерностей невозможно решение проблем, разрабатываемых этими науками. Особенно же тесная взаимосвязь имеется, как отмечалось выше, между общей цитологией, структурной биохимией, молекулярной биологией и генетикой. Этот тесный контакт выражается, в частности, в использовании в цитологических работах биохимических и молекулярно-биологических методов и, наоборот, в применении в биохимических и молекулярно-биологических исследованиях цитологических морфологических методов. Сходные методы и единство конечных целей смежных наук обусловили формирование новой синтетической науки о клетке — биологии клетки. Она объединяет цитологию, структурную биохимию, молекулярную биологию, молекулярную генетику и частные биологические науки, исследующие клеточный уровень организации. Такое объединение смежных наук, несомненно, прогрессивное явление. Однако, несмотря на подобный синтез, каждая из наук сохраняет и свою методическую специфику, и специфику в постановке и способах разработки проблем организации клеток. В настоящее время доминирующее положение в этой синтетической науке занимают исследования молекулярно-биологического и молекулярно-генетического направлений. Такое положение обусловлено необходимостью углубления наших знаний



о низших уровнях организации клеток, но оно представляет собой лишь временное явление.

По сути дела ведущая роль в новой синтетической науке о клетке должна принадлежать общей цитологии — науке об общих закономерностях клеточного уровня организации живой материи. Из современных биологических наук, исследующих этот уровень организации, общая цитология, расширяя целенаправленный сравнительно-цитологический подход, базирующийся на структурно-биохимических методах, наиболее подготовлена к глубокому обобщению огромного фактического материала, полученного при дискретном анализе отдельных клеточных структур в многочисленных разновидностях клеток. Ведущее положение должна занять общая цитология и в анализе клеточных интегративных механизмов. Важной предпосылкой к этому является интенсивная разработка новых экспериментальных моделей. Их углубленный анализ современными методами и широкое внедрение экспериментальных моделей в целенаправленные сравнительно-цитологические исследования должны обеспечить прогресс в решении одной из основных проблем организации клеток — проблемы клеточной интеграции.

По мере накопления фактического материала об элементарных универсальных механизмах интеграции клетки и размахе их модификаций именно перед общей цитологией стоит задача провести глубокий анализ исторической обусловленности организации частных клеточных систем и клеточной организации в целом, а также специфики эволюционного процесса на клеточном и субклеточном уровнях организации живой материи. Решению этой задачи способствует отчетливо проступающая сейчас в общецитологических исследованиях тенденция к сочетанию дискретного анализа отдельных компонентов клетки с изучением ее как целостной системы.



## ПОВЕРХНОСТНЫЙ АППАРАТ КЛЕТОК И ЦИТОСКЕЛЕТ

### 2.1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Все прокариотные и эукариотные клетки состоят из трех частей: поверхностного аппарата, цитоплазмы и ядерного аппарата. Через поверхностный аппарат клетка взаимодействует с внешней средой и с соседними клетками. Этим определяются универсальные, общие для всех разновидностей клеток, функции поверхностного аппарата: барьерная, транспортная и рецепторная. Кроме того, в специализированных клетках, наряду с общими, он может осуществлять и ряд специфических функций, присущих лишь данному типу клеток (например, механическая, тургорная функция клеточной стенки растительных клеток).

В поверхностном аппарате эукариотных клеток различают три подсистемы: плазматическую мембрану, надмембранный комплекс и субмембранную часть опорно-сократимого аппарата гиалоплазмы (рис. 1).

Одним из крупных достижений цитологических исследований последнего времени следует считать выяснение структурно-химической организации подсистем поверхностного аппарата с помощью дискретного и интегративного анализа. Результаты этих исследований, полученные вначале на ограниченном круге объектов (главным образом на культивируемых *in vitro* клетках млекопитающих), стимулировали работы по выявлению особенностей поверхностных аппаратов у различных специализированных эукариотных и прокариотных клеток. Таким образом возникло специальное направление в биологии клетки — изучение закономерностей организации поверхностного аппарата, — направление, равноценное анализу рабочего аппарата цитоплазмы или ядерных структур.

В настоящей главе мы рассмотрим состояние проблемы исследования структурно-химической организации поверхностного аппарата и цитоскелета и на примере реализации некоторых клеточных функций покажем взаимосвязь и единство подсистем поверхностного аппарата.



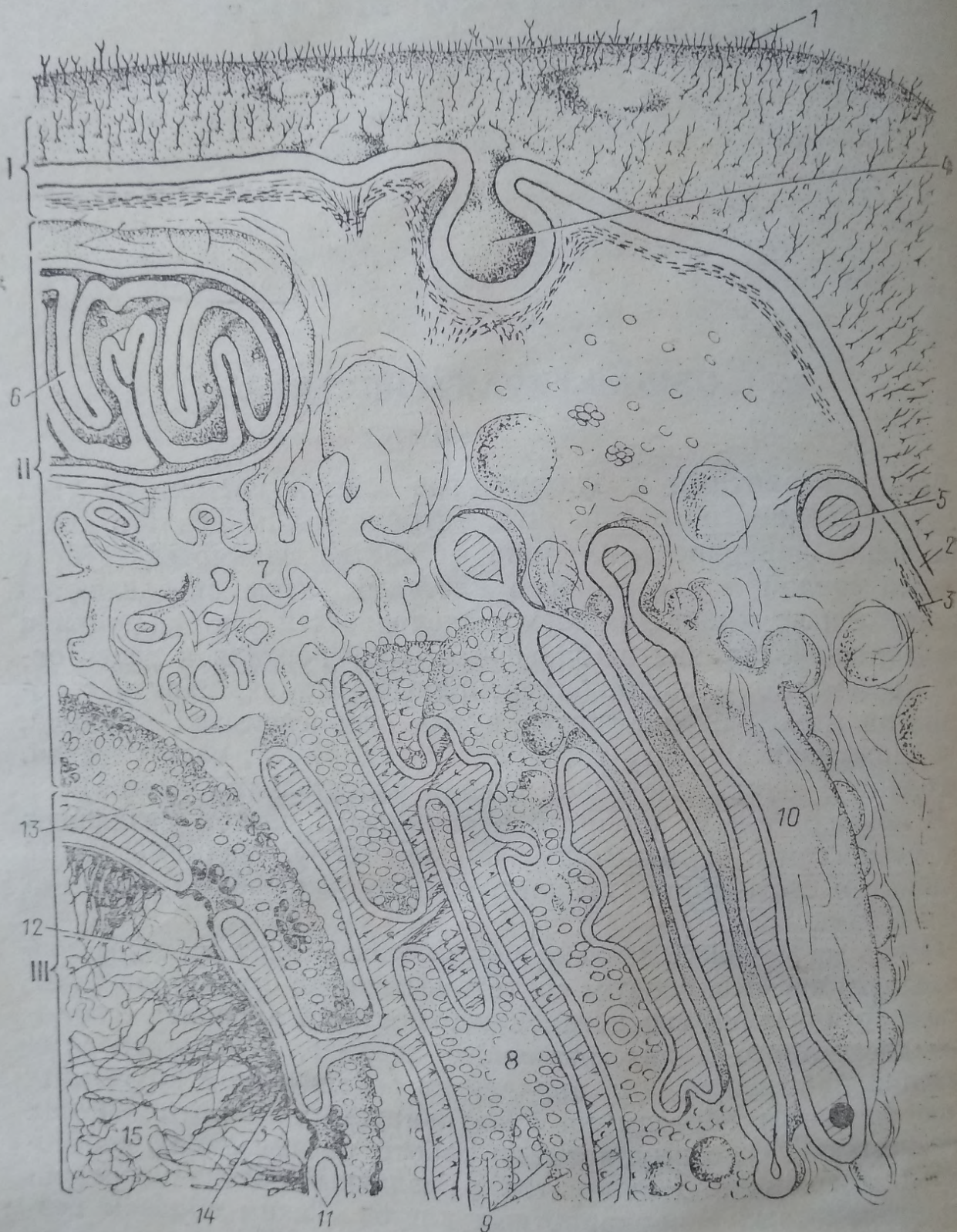


Рис. 1. Организация эукариотной клетки.

I — поверхностный аппарат, II — цитоплазма с органоидами, III — ядерный аппарат.  
 1 — надмембранные структуры поверхностного аппарата, 2 — плазматическая мембрана,  
 3 — субмембранный аппарат гиалоплазмы, 4 — пиноцитозная вакуоль, 5 — секреторная  
 гранула, 6 — митохондрия, 7 — гладкая эндоплазматическая сеть, 8 — шероховатая эндо-  
 плазматическая сеть, 9 — рибосомы, 10 — цистерны аппарата Гольджи, 11 — мембраны  
 ядерной оболочки, 12 — перинуклеарное пространство, 13 — поровые комплексы, 14 —  
 плотная пластинка поверхностного аппарата ядра, 15 — хроматин.



## 2.2. ОРГАНИЗАЦИЯ ПОВЕРХНОСТНОГО АППАРАТА И ЦИТОСКЕЛЕТА

### 2.2.1. ПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ МЕМБРАНА

Плазматическая мембрана — основная, универсальная для всех клеток субсистема поверхностного аппарата. Основные химические компоненты плазматической мембраны — это белки и липиды. Их количественное соотношение в мембранах разных клеток может варьировать в довольно широких пределах. Для большинства эукариотных клеток оно составляет 1 : 1, у прокариот в плазматической мембране преобладают белки.

Изучение организации плазматической мембраны началось в первой половине XX в. В 1925 г. Е. Гorter и Ф. Грендель экстрагировали из «теней» эритроцитов\* липиды и определили их количество на поверхности одного эритроцита. По данным этих авторов, липидов на поверхности эритроцитов достаточно для образования сплошного билипидного слоя. Впоследствии выяснилось, что Гorter и Грендель допустили две ошибки: во-первых, с помощью примененных ими методов они смогли экстрагировать лишь часть липидов и, во-вторых, неточно определили величину поверхности эритроцита. Однако эти ошибки не отразились на результате, поскольку фактическое соотношение определяемых показателей случайно оказалось верным. Таким образом, идея о существовании билипидного слоя, высказанная Gorter и Гренделем, оказалась справедливой. По их представлениям, основу клеточной мембраны составляет двойной слой липидных молекул, обращенных гидрофобными цепями жирных кислот друг к другу, а полярными гидрофильными головками — наружу. Идея о наличии в составе мембраны липидной фазы, организованной на основе гидрофильных и гидрофобных взаимодействий, сохраняет свое значение до настоящего времени.

Последующий анализ свойств искусственных билипидных пленок в модельных опытах показал, что их поверхностное натяжение намного выше, чем у мембраны клеток. При добавлении к липидным пленкам белка поверхностное натяжение системы снижалось. Учитывая эти факты и данные о химическом составе мембран, логично было предположить, что в структуре плазматических мембран большую роль играют белки. В связи с этим в 1935 г. Дж. Даниэли и Г. Дэвсон предложили первую, так называемую «бутербродную» модель организации мембраны (рис. 2). Согласно этой модели основу мембраны составляет двойной слой липидных молекул, обращенных друг к другу гидрофобными участками, а внешняя и внутренняя поверхности билипидного слоя, образованные гидрофильными головками моле-

\* «Тени» эритроцитов — безъядерные гемолизированные эритроциты млекопитающих, представляющие собой в сущности поверхностный аппарат клетки.



кул, покрыты сплошными слоями белка. Эта умозрительная модель получила морфологическое подтверждение в первых ультраструктурных исследованиях, выполненных в середине 50-х годов. В клетках была выявлена универсальная структура — трехслойные мембраны толщиной до 10 нм, состоящие из двух периферических электронно-плотных слоев и более толстого промежуточного слоя. Эта структура отвечала бутербродной модели Даниэли и Дэвсона: светлый слой представлял собой гидрофобную часть билипидной фазы, а электронно-плотные слои — гидрофильные головки липидных молекул и сплошные поверхностные слои белка (рис. 2, А).

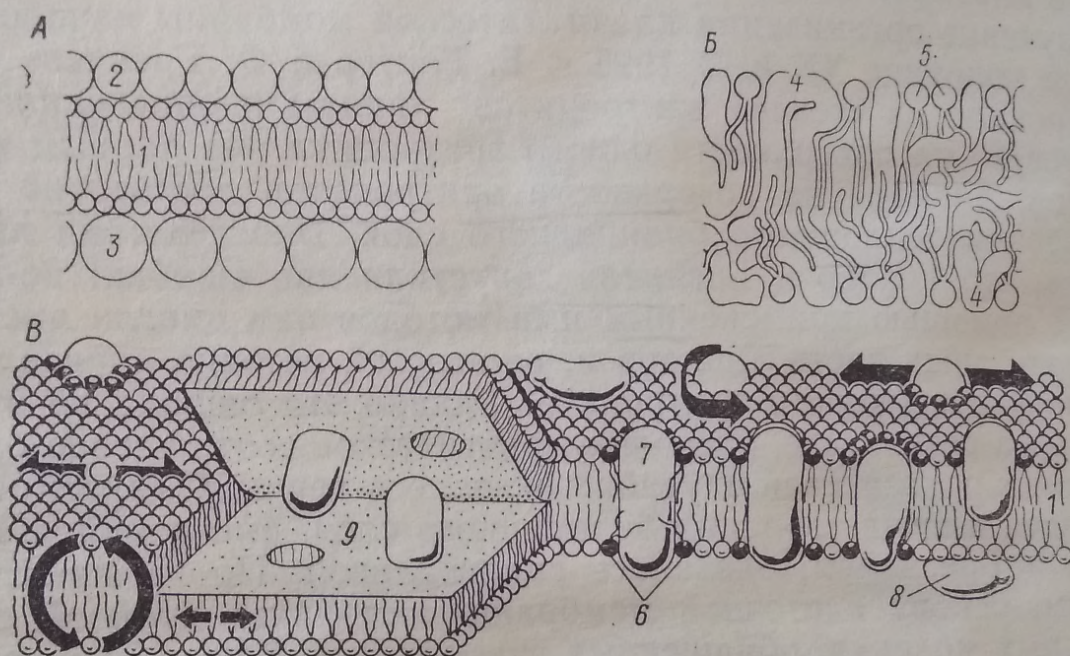


Рис. 2. Модели организации мембран: бутербродная (А), плетеного коврика (Б), жидкостно-мозаичная (В).

1 — билипидный слой; 2 — внутренний и 3 — наружный белковые слои; 4, 5 — сложные комплексы белков (4) и липидов (5); 6 — липиды, прилегающие к белковым глобулам; 7 — интегральные и 8 — периферические белки; 9 — участок скола мембраны. Стрелками указаны возможные направления перемещения белковых и липидных молекул.

Соответствие умозрительной модели результатам морфологических наблюдений создало впечатление о том, что проблема организации биологических мембран в принципе решена и «бутербродная» модель Даниэли и Дэвсона вполне справедлива. Кроме того, интенсивное изучение клеточных мембранных структур на первом этапе электронно-микроскопических исследований свидетельствовало в пользу универсальности их организации, в связи с чем в 60-х годах Дж. Робертсоном была сформулирована теория унитарной биологической мембраны, в которой постулировалось трехслойное строение всех клеточных мембран. (В учебной литературе эти представления были vulgarизированы допущением возможности прямого перехода плазматической мембраны в мембраны эндоплазматической сети.)



Однако уже с середины 60-х годов начали накапливаться факты, прямо или косвенно свидетельствующие против унитарной теории организации мембран и основных положений «бутербродной» модели. В частности, оказалось, что четкую трехслойную структуру при электронно-микроскопическом исследовании обнаруживают далеко не все мембраны. Появилось значительное количество данных, свидетельствующих о глобулярной структуре мембраны, причем это касалось как отдельных разновидностей мембран, так и разных участков одной и той же мембраны. Более того, оказалось, что ультраструктура мембран в значительной степени зависит от способа фиксации материала. В связи с этим даже стали высказывать мнения о непригодности обычных электронно-микроскопических методов фиксации и обработки материала для изучения организации мембран.

Много фактов, труднообъяснимых с позиций «бутербродной» модели, было получено в цитофизиологических исследованиях. В частности, анализ процессов трансмембранного транспорта показал, что мембрана, по-видимому, гораздо лабильнее и динамичнее, чем это следует из «бутербродной» модели. Кроме того, значительная часть мембранных белков имеет глобулярную структуру, что также противоречит положениям этой модели, а легко экстрагируемые белки, т. е. те, которые удаляются агентами, разрушающими электростатические взаимодействия, составляют лишь малую часть мембранных белков. В основном же это трудно экстрагируемые белки, связанные с липидами не электростатическими, а более прочными взаимодействиями.

Наконец, веским аргументом против трехслойной модели служит термодинамическая неустойчивость такого рода системы. Так как гидрофильные компоненты липидного слоя, согласно Даниэли и Дэвсону, изолированы от водной фазы сплошным слоем белковых молекул, то для поддержания такой структуры требуются значительные затраты энергии. В то же время белково-липидная система мембран в живой природе должна строиться на более выгодных термодинамических условиях. Среди многочисленных моделей мембран, предложенных в середине 60-х годов, начали выделяться те, в которых постулировалось наличие гидрофобно-гидрофильных взаимодействий, причем не только между липидными молекулами, но и между липидами и белками.

Согласно одной из таких моделей — модели липопротеинового коврика — мембраны образованы переплетением липидных и белковых мицелл (рис. 2, Б). Однако эта жесткая система реализуется, по-видимому, лишь в определенных участках некоторых мембран.

Наиболее универсальной и жизнеспособной из рассматриваемых моделей оказалась так называемая жидкостно-мозаичная модель Зингера—Николсона (рис. 2, В), которая также посту-



лирует наличие двойного слоя строго ориентированных липидных молекул. Однако, в отличие от взглядов Даниэли и Дэвсона, по жидкостно-мозаичной модели белки мембраны не образуют сплошного слоя на внутренней и внешней ее поверхностях.

Согласно представлениям С. Зингера и Г. Николсона, в состав мембраны входят белки двух разновидностей: периферические и интегральные. Периферические белки действительно связаны с полярными головками липидных молекул электростатическими взаимодействиями. Но они никогда не образуют сплошного слоя и, по сути дела, не являются белками собственно мембраны, а скорее связывают ее с над- или субмембранной системой поверхностного аппарата клетки. Основную роль в организации мембраны играют интегральные глобулярные белки, связанные с липидами гидрофобными взаимодействиями. Как правило, эти белки либо более или менее глубоко погружены в мембрану, либо пронизывают ее насквозь (см. ниже).

Такая организация мембраны предполагает возможность латерального смещения интегральных белковых глобул, т. е. динамичность и лабильность системы. Большим достоинством жидкостно-мозаичной модели является также ее термодинамическая устойчивость: для поддержания этой структуры не нужны затраты энергии.

Как следует из вышеизложенного, жидкостно-мозаичная модель организации мембраны значительно лучше соотносится с биохимическими данными по кинетике экстракции белков из мембранных фракций; кроме того, она находится в полном соответствии с реальными фактами преобладания в клеточных мембранах глобулярных белков.

К настоящему времени накопилось много морфобиохимических и экспериментально-цитологических данных в пользу жидкостно-мозаичной модели. Например, такие данные получены при использовании метода замораживания-скалывания, наиболее адекватного для морфологического исследования мембран. Сколы чаще всего проходят по середине гидрофобной фазы мембраны, и на репликах сколотых поверхностей удается видеть или бугорки глобул интегральных белков, выступающих над липидным слоем, или углубления на его поверхности, соответствующие местам расположения белковых глобул (рис. 2, В). Это связано с тем, что белковая молекула не раскалывается и отходит целиком в одну из половин «расщепленной» мембраны. Оказалось, что количество глобул интегральных белков и характер их расположения в мембране специфичны не только для плазматических мембран клеток различной специализации, но даже и для разных участков плазматических мембран одной и той же клетки, чаще всего узкоспециализированной, например, мембраны мужской половой клетки — сперматозоида.

Доказательства латерального перемещения белковых глобул в плоскости мембраны были получены в опытах по гибридиза-



ции клеток разных видов млекопитающих и определению видов-специфичных белков в плазматической мембране гибридной клетки методами иммуноцитохимии. Результаты экспериментов показывают, что через некоторое время после объединения плазматических мембран клеток человека и мыши «человеческие» и «мышинные» белки равномерно распределяются в плазматической мембране гибридной клетки (гетерокариона). Выравнивание концентрации белковых молекул может происходить благодаря свободной диффузии в плоскости мембраны, происходящей без затраты энергии.

Итак, по жидкостно-мозаичной модели интегральные белки, «мозаично» распределенные в мембране, способны к латеральному перемещению в жидкостной липидной фазе. Такая модель предполагает возможность изменения степени жидкостности мембраны (см. ниже).

Создание жидкостно-мозаичной модели организации биологических мембран стимулировало изучение конкретных физико-химических свойств разнообразных липидов и белков, входящих в состав клеточных мембран.

**Липиды.** Липидный состав клеточных мембран многообразен и специфичен. Липидная фаза мембран у большинства клеток образована главным образом фосфолипидами. Наиболее распространенные из них — фосфоглицериды — производные фосфатидной кислоты: фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилинозит и фосфатидилсерин. Они имеют сходную структуру и состоят из гидрофильной полярной головки, образованной соответственно спиртами холином, этаноламином или инозитом и аминокислотой серином, и двух гидрофобных «хвостов» — углеводородных цепей остатков жирных кислот, связанных со спиртом глицерином.

Мембранные липиды другого класса — сфинголипиды — также состоят из полярной головки и двух неполярных «хвостов», один из которых образован остатком жирной кислоты, а другой — остатком длинноцепочечного аминоспирта сфингозина или его производных. Липиды этого класса, содержащие остатки сахаров, относят к гликолипидам.

Гликолипидов в мембране сравнительно немного. Их углеводная часть может достигать больших размеров. Среди гликолипидов выделяют класс ганглиозидов, содержащих остатки моносахаров и один или несколько остатков N-ацетилнейраминовой или сиаловой кислоты. Такие липиды входят в состав гликокаликса (основного надмембранного компонента поверхностного аппарата клетки).

Гликолипидам приписывают важную роль в рецепторной функции мембраны. Например, большое значение для работы химических синапсов имеют ганглиозиды. Их состав меняется при злокачественном перерождении клетки. Гликолипиды плазматической мембраны эритроцитов у человека определяют груп-



пу крови. Предполагают, что именно липиды необходимы для осуществления межклеточных коммуникаций в процессах эмбрио- и гистогенеза.

Важным компонентом плазматической мембраны животных клеток является стероидный липид холестерол. Молекула холестерола состоит из четырех конденсированных углеводородных колец. Одна ее часть гидрофильна, а другая гидрофобна и погружена в билипидный слой. Количество холестерола в мембране может варьировать и в значительной мере определяет степень жидкостности мембраны: чем больше холестерола, тем ниже жидкостность мембраны. У прокариот стероидные липиды встречаются довольно редко; в частности, они обнаружены у микоплазм и цианобактерий. У растительных клеток такие липиды представлены фитостеролами. Повышает жидкостность мембраны также и присутствие одноцепочечных диольных липидов (в их состав входит один остаток жирной кислоты); этими липидами обогащены мембраны клеток прорастающих семян и интенсивно регенерирующих тканей.

Степень жидкостности мембраны может определяться не только количественным составом липидов (в частности, относительным содержанием холестерола), но и соотношением насыщенных и ненасыщенных остатков жирных кислот в липидных молекулах. Чем больше в мембране остатков ненасыщенных жирных кислот, тем выше степень ее жидкостности.

Пластичность липидного компонента мембран ярко проявляется при адаптации животных к изменениям температуры окружающей среды. Так, в клеточных мембранах в зависимости от температуры может в широких пределах меняться степень насыщенности жирных кислот. Регуляция жидкостности мембранной фазы имеет большое значение, так как состояние липидного компонента влияет на активность мембранных ферментов.

Одним из основных свойств липидов плазматической мембраны является их способность к свободному латеральному перемещению и вращению. Возможен и переход молекул из одного монослоя в другой, как бы перекувыркивание (так называемый «флип-флоп»), но это происходит достаточно редко и с меньшей скоростью, чем латеральная диффузия.

Бислойная плазматическая мембрана асимметрична по составу липидов. В наружном монослое сосредоточены практически все гликолипиды; различные фосфолипиды распределены в бислое также неравномерно. Например, в плазматической мембране эритроцита в наружном монослое преобладает фосфатидилхолин, а во внутреннем — фосфатидилэтаноламин. Углеводородные цепи жирных кислот во внешнем монослое длиннее и, как правило, более насыщенные, чем во внутреннем. Асимметрия бислоя обеспечивает ряд важных свойств мембран и поддерживается в процессе функционирования с помощью разных механизмов, в частности, если истощить клетку по АТФ, то



асимметрия будет нарушена и липидный состав монослоев выравнивается.

Особое положение в бислое занимают и липиды, непосредственно примыкающие к глобулярным интегральным белкам мембраны. Они, как правило, более упорядочены и менее подвижны, чем в безбелковых участках мембраны. Белково-липидные межмолекулярные взаимодействия имеют существенное функциональное значение. Например, многие белки или белковые комплексы вообще не могут нормально функционировать без соответствующего липидного окружения.

Несмотря на универсальный характер рассмотренного типа организации липидного бислоя плазматической мембраны про- и эукариотных клеток, его нельзя считать единственно возможным. В последнее время появляются данные о том, что в функционирующих плазматических мембранах гораздо чаще, чем предполагалось, встречаются участки с временными или более-менее постоянными нарушениями типичной билипидной структуры. Такие нарушения могут происходить, если в мембране увеличено относительное количество интегральных белков (клетки прокариот, специализированные участки мембран метазойных клеток).

Весьма своеобразно устроена наружная мембрана грацил- и кутных бактерий, значительная часть которой представлена липопротейнами и липополисахаридами. У прокариот можно найти и другие варианты необычной организации мембран. Например, у некоторых археобактерий вместо фосфолипидного бислоя имеется монослой дибифитанилтетраглицерида. Мембрана хлорокомы зеленых аноксигенных фототрофных бактерий образована гликолипидным монослоем. Своеобразно построены мембраны бактериальных включений — газовых везикул, серных частиц, карбоксисом и др., достаточно широко распространенных у прокариот. Они состоят из монослоя белка толщиной 3,5 — 4 нм. При этом гидрофильные и гидрофобные аминокислоты распределены в белковой молекуле таким образом, что образуют срединный гидрофобный и наружные гидрофильные участки.

Эти примеры отступления от обычного типа организации мембран свидетельствуют о возможности варьирования мембранных компонентов при сохранении основного принципа гидрофобно-гидрофильных взаимодействий.

**Белки.** Если липиды являются идеальными соединениями для реализации универсальных барьерных свойств мембран, то белки обеспечивают выполнение важнейших клеточных функций — регулируемого транспорта, рецепции, структурной организации процессов метаболизма и др.

Интегральные белки мембраны прочно связаны с липидами; в отличие от легкоэкстрагируемых периферических белков их нельзя выделить из мембран, не разрушив билипидный слой.

Интегральные белки можно разделить на следующие груп-



пы: белки, пересекающие мембрану (трансмембранные белки; рис. 3, А, Б), и белки, располагающиеся вне билипидного слоя, но ковалентно связанные с липидами либо непосредственно, либо через олигосахарид, связанный с фосфатидилинозитолом наружного монослоя (рис. 3, В).

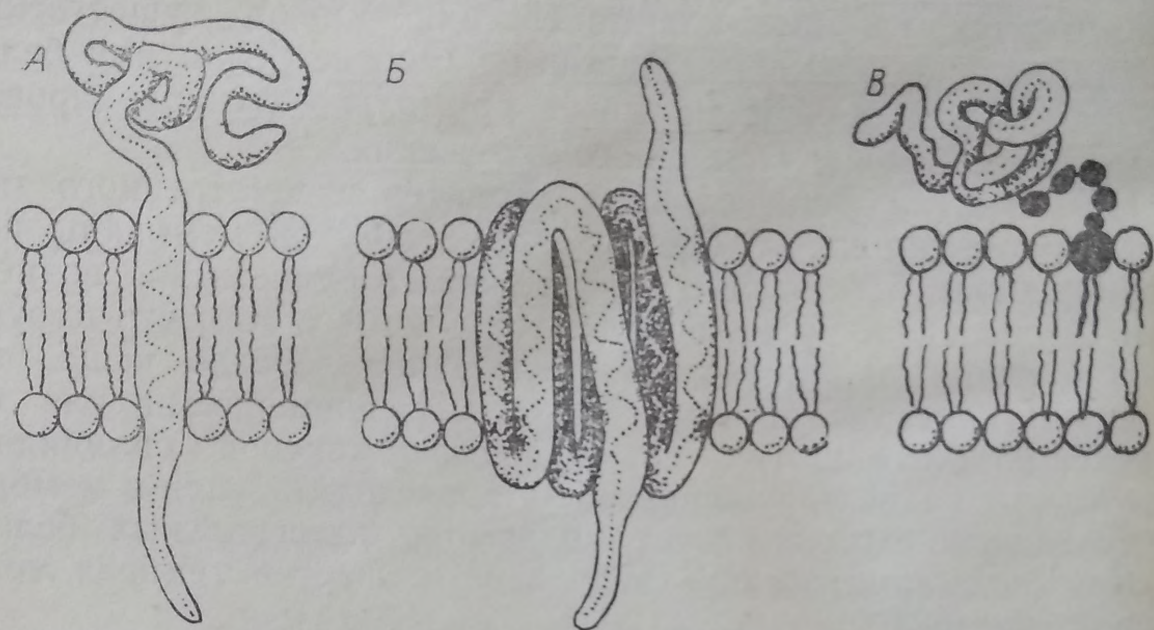


Рис. 3. Взаимоотношения интегральных белков с билипидным слоем мембраны.

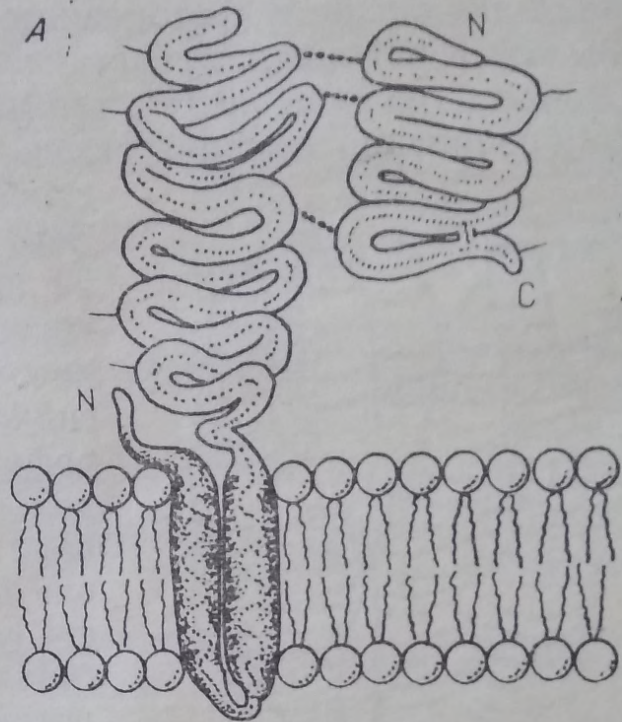
А — белки с одним гидрофобным участком; Б — белки с несколькими гидрофобными участками; В — белки, связанные с фосфатидилинозитолом через олигосахаридный «мостик».

Среди трансмембранных белков можно выделить белки, закрепленные в мембране лишь концевым участком, т. е. большая часть их молекулы располагается вне бислоя (рис. 3, А), и белки, прошивающие мембрану несколько раз и образующие глобулу (рис. 3, Б). Белки первого типа часто связаны с многочисленными углеводными остатками и являются, по существу, гликопротеинами. Их основная функциональная часть находится за пределами билипидного слоя и входит в состав гликокаликса. Гидрофобный  $\alpha$ -спиральный концевой участок таких белков погружен в мембрану. Как правило, белки такого рода выполняют рецепторные функции. Типичным примером этого могут служить антигенраспознающие рецепторы В-лимфоцитов, образованные мембранными формами иммуноглобулинов классов М и D. Их антигенсвязывающие участки принадлежат вариабельным доменам молекул, расположенным за пределами билипидного слоя. Каждый мономер содержит  $\alpha$ -спиральный гидрофобный участок, входящий в состав мембраны.

Аналогичное строение имеют и другие рецепторы обширного надсемейства иммуноглобулинов, а также рецепторы других семейств и надсемейств. К этому же типу можно отнести интегральные белки, выполняющие специфические ферментативные функции, например сахараза-изомальтазный комплекс. Он рас-



положен в мембранах микроворсинок всасывающих клеток кишечного эпителия и представляет собой димерный комплекс, короткая цепь которого (сахараза) и большая часть длинной цепи (изомальтаза) находятся за пределами бислойа и обращены в просвет кишки. Лишь небольшой концевой участок длинной цепи образует гидрофобную  $\alpha$ -спираль, которая заякоривает весь комплекс в мембране. Таким образом, рабочая часть этого ферментативного комплекса с двумя активными центрами входит в состав гликокаликса, где и осуществляет процессы пристеночного пищеварения (рис. 4, А).



Белки второго типа обычно осуществляют транспортные функции. Примером таких интегральных белков служит Bd3-гликопротеин мембраны эритроцита — димер, представленный идентичными молекулами (рис. 4, Б). Гидрофобные аминокислотные остатки образуют в каждой молекуле пять спиральных участков, пронизывающих мембрану и формирующих в совокупности анионные каналы, обеспечивающие транспорт анионов  $\text{HCO}_3^-$ . Небольшая гликопротеиновая часть молекулы входит в состав гликокаликса. Она определяет группу крови и изменяется при старении эритроцита. За пределами бислойа с цитоплазматической стороны расположен довольно протяженный участок молекулы, связанный с периферическим цитоскелетом.

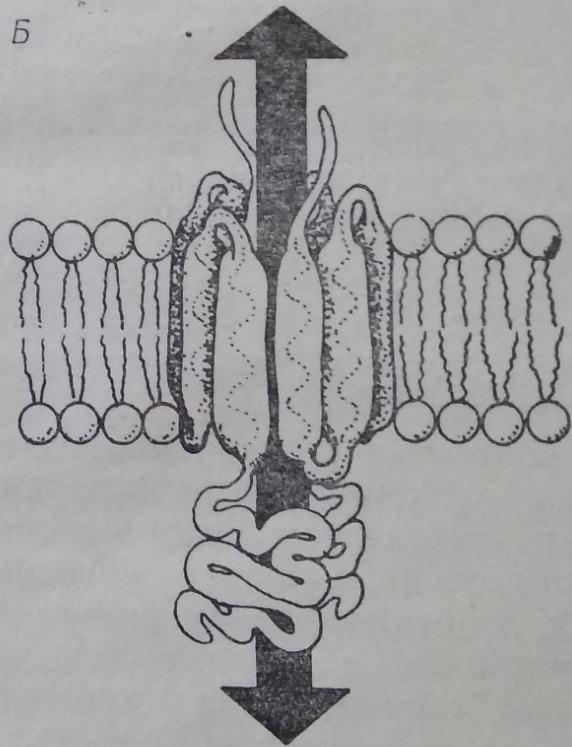


Рис. 4. Сахараза-изомальтазный комплекс всасывающей клетки кишечного эпителия (А) и белок Bd3 эритроцита (Б).

Стрелками показан транспорт анионов.



Один из наиболее изученных белков второго типа — бактериородопсин хромопротеин, входящий в состав так называемой пурпурной мембраны архебактерий и во многих отношениях схожий с родопсином фоторецепторов животных. Бактериородопсин, как и родопсин, представляет собой белок (бактериородопсин), ковалентно связанный с хромофором ретиналем. Молекулы бактериородопсина располагаются в плазматической мембране

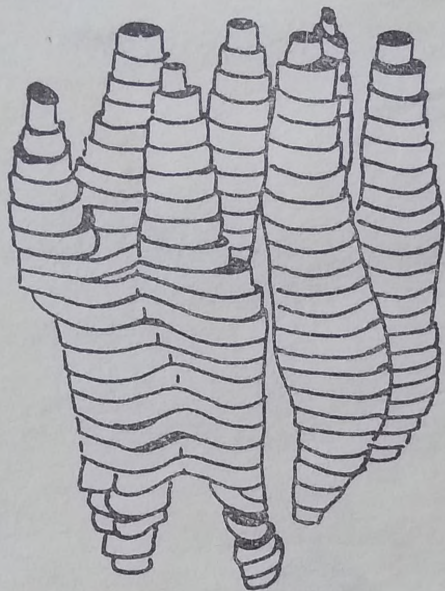


Рис. 5. Реконструкция молекулы бактериородопсина (по: Henderson, Unwin, 1975).

строгим образом. Этот белок молекулярной массой 20 кДа содержит семь участков гидрофобных аминокислот, разделенных последовательностями гидрофильных аминокислот. Гидрофобные участки в виде  $\alpha$ -спиральных цепей семь раз пронизывают мембрану (рис. 5). В районе одного из гидрофобных участков расположена молекула ретиналя — хромофора, идентичного ретиналю светочувствительных клеток животных. Бактериородопсин работает как простейшая фотосинтетическая система. Возбужденный светом бактериородопсин выступает в роли протонной помпы, транспортируя протоны из цитоплазмы во внешнюю среду. При этом создается элек-

трохимический градиент. Эта энергия может использоваться для любой работы — движения жгутика, синтеза АТФ, активного транспорта.

В основе действия фоторецепторов животных лежит тот же принцип организации регулируемого светом канала, представленного комплексом белка и ретиналя.

Хотя опсины разных животных могут существенно различаться, особенно у таких филогенетически удаленных групп, как членистоногие и позвоночные, между ними, по-видимому, существует определенная гомология. Между бактериальным и животным родопсинами процент гомологии невелик.

Объединение мембранных белков в комплексы широко распространено при формировании различного рода каналов или насосов, обеспечивающих трансмембранный транспорт ионов и органических соединений типа аминокислот, глюкозы и т. д. Осуществление переноса веществ является одной из основных функций мембраны. В зависимости от механизмов транспорта можно выделить целый ряд его категорий, среди которых три основных: диффузия, облегченная диффузия (пассивный транспорт) и активный транспорт.



Диффузия малых неполярных молекул может происходить по градиенту концентрации через билипидный слой. Для перемещения крупных и полярных молекул по градиенту концентрации необходимы специальные белковые каналы в мембране; обычно они бывают двух типов: регулируемые (с «крышкой», заслонкой) и нерегулируемые (без «крышки»).

Перемещение веществ в клетку и из клетки по градиенту их концентрации может происходить также с помощью специальных белков-переносчиков, благодаря конформационным изменениям этих белков. Такой способ транспорта носит название облегченной диффузии.

Наконец, наиболее важный для живых систем вид транспорта — это активный мембранный транспорт. Его принципиальное отличие от пассивного транспорта или диффузии состоит в возможности переноса веществ против градиента концентрации. Естественно, что для этого в мембране должны быть специальные насосы, работающие с использованием энергии (чаще всего энергии АТФ).

Одним из наиболее древних и широко распространенных мембранных насосов является так называемая  $K, Na$ -АТФаза. Благодаря ее работе из клетки непрерывно удаляются ионы  $Na^+$  и закачиваются в клетку ионы  $K^+$ . Таким образом поддерживается разность концентраций этих ионов в клетке и в наружной среде, что лежит в основе многих биоэлектрических и транспортных процессов. В молекуле  $K, Na$ -АТФазы имеются специальные участки связывания ионов  $Na^+$  и  $K^+$ . Их транспорт обеспечивается циклическими конформационными изменениями белкового комплекса, происходящими с затратой энергии. Такой насос представляет собой тетрамерную структуру, состоящую из субъединиц двух типов —  $\alpha$ - и  $\beta$ - — молекулярной массой соответственно 95 и 45 кДа. Они образуют два  $\alpha$ ,  $\beta$ -протомера высотой 10 нм;  $\alpha$ -субъединица имеет семь  $\alpha$ -спиральных трансмембранных участков, при этом около 2/3 молекулы располагается по обе стороны билипидного слоя; цитоплазматический домен значительно крупнее надмембранного. N-конец  $\alpha$ -субъединицы обращен в цитоплазму.  $\beta$ -субъединица имеет четыре гидрофобных участка и выступает только на внешнюю сторону мембраны; ее N-концевой участок обращен наружу и несет углеводный остаток. Получено и трехмерное компьютерное изображение структуры  $K, Na$ -АТФазы, свидетельствующее о ее сложной конфигурации. Ведутся работы по дальнейшей детализации структурно-химической организации этого комплекса.

Анализ  $K, Na$ -АТФазы разных объектов и клеток разных тканей одного животного показал, что несмотря на универсальное функциональное значение  $K, Na$ -АТФазы представлена у эукариот несколькими модификациями, для каждой из которых имеются свои структурные гены.

В мембране обнаруживаются и другие натриевые каналы, со-



стоящие из трех белковых субъединиц молекулярной массой около 20, 40 и 300 кДа.

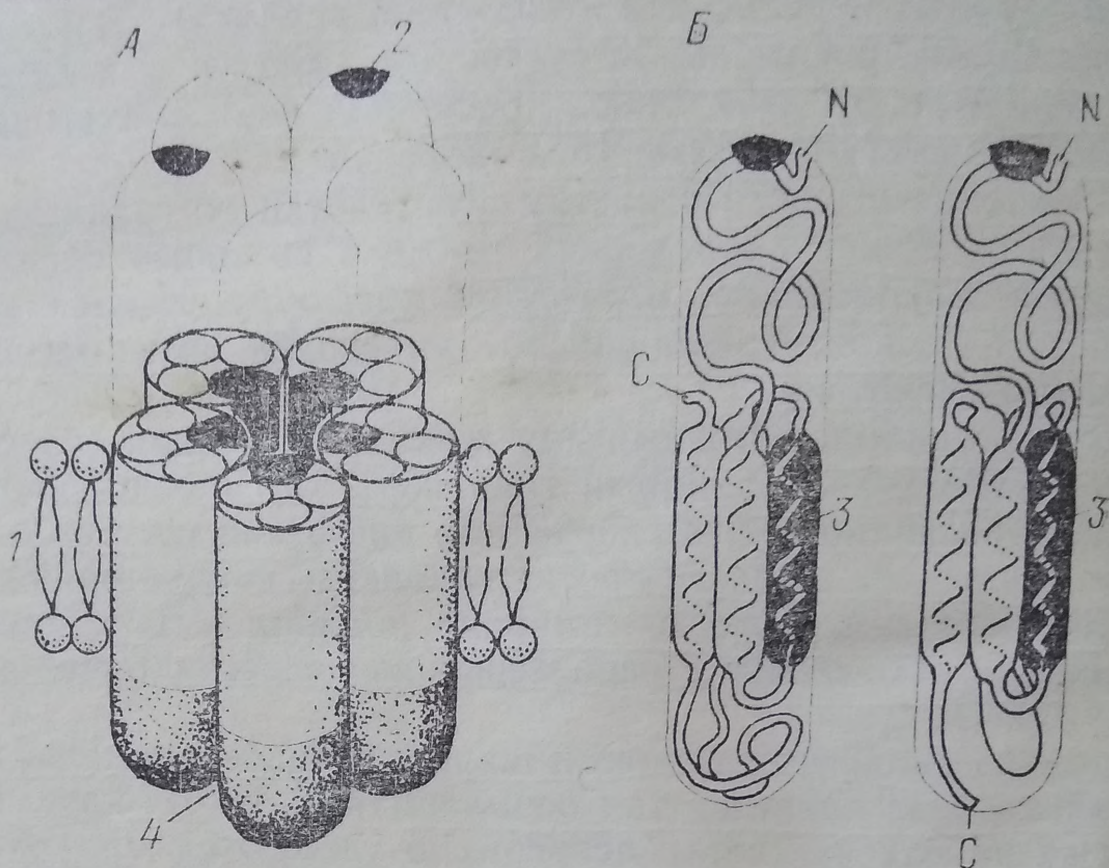


Рис. 6. Организация холинрецептивного белкового комплекса.

А — общий вид, Б — варианты строения субъединицы. 1 — мембрана; 2 — центр связывания ацетилхолина; 3 —  $\alpha$ -спиральный участок молекулы, образующий стенку канала; 4 — цитоплазматическая часть рецептора.

Еще одним и наиболее изученным примером белковых комплексов, сочетающих в себе функцию рецептора и регулируемого канала для транспорта катионов (ионы  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ), являются холинрецептивные белки в постсинаптической мембране холинэргических синапсов (рис. 6). В плазматической мембране электрических органов (видоизмененных мышц) ската холинорецепторы представлены белковым комплексом из пяти субъединиц, в одной из которых локализован центр связывания ацетилхолина (рис. 6, А). На внешней стороне мембраны в непосредственной близости от этого комплекса располагается периферический белок — фермент ацетилхолинэстераза. В целом белковая система рецептор—фермент работает как регулируемый ионный канал для  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ . При задействовании рецептора медиатором канал открывается и остается открытым до тех пор, пока медиатор не будет разрушен ацетилхолинэстеразой. За это время происходит перераспределение ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  между клеткой и средой, благодаря чему и генерируется электрический импульс.

Методами генной инженерии уже выделены гены, кодирующие иРНК для каждой субъединицы холинрецептивных комплексов, и продолжаются интенсивные молекулярно-биологические исследования механизмов их работы. Показано, например, что все белки комплекса имеют четыре или пять  $\alpha$ -спиральных



гидрофобных аминокислотных последовательностей, и в образовании стенки регулируемого канала участвуют по одной из таких последовательностей каждого белка, входящего в комплекс (рис. 6, Б, В).

Естественные каналы и насосы характеризуются строгой поляризованностью, относительно низкой энергией активации, значительной селективностью и большой мощностью. В опытах с включением белков в искусственные мембраны были смоделированы каналы с некоторыми из перечисленных выше свойств. Однако получить искусственные каналы, полностью имитирующие природные, т. е. обладающие совокупностью всех их признаков, пока не удалось.

Одним из фундаментальных свойств белков биологических мембран в соответствии с жидкостно-мозаичной моделью является их принципиальная способность к латеральному перемещению и вращению в горизонтальной плоскости. По образному выражению создателей жидкостно-мозаичной модели, белки мембран — «корабли», которые свободно плавают в липидном «море». Свободное перемещение белков в мембране действительно было показано на ряде метазойных клеток, в частности на лимфоцитах млекопитающих. Однако по мере углубления наших знаний о мембранных белках и поверхностном аппарате клеток как целостной системе, становится ясным, что подвижность этих белков у эукариот весьма ограничена. Механизмы ее ограничений многообразны — это и связь белков с примембранными слоями (особенно с периферическими элементами цитоскелета), и некоторые типы постоянных межклеточных контактов (см. ниже), и взаимодействие белков между собой и с липидами, а также с периферическими белками. Наконец, как будет видно дальше, латеральное перемещение белков в мембране может быть обусловлено направленной работой периферического цитоскелета и белков субмембранного цитозоля.

Итак, по современным взглядам на организацию мембраны, она представляет собой липидно-белковую систему, для которой характерны сложные взаимодействия как внутри липидной фазы (асимметричные монослои) и в белковых комплексах, так и между липидами и белками. Кроме того, поскольку мембрана является лишь частью поверхностного аппарата клеток, то и другие его компоненты — надмембранные и особенно субмембранные структуры — также участвуют в поддержании стабильности белков в мембранах (в основном это касается эукариот).

### 2.2.2. СУБМЕМБРАННАЯ ЧАСТЬ ПОВЕРХНОСТНОГО АППАРАТА И ЦИТОСКЕЛЕТ

У эукариотных клеток субмембранная часть поверхностного аппарата расположена в периферическом слое гиалоплазмы (примембранном цитозоле). Она занимает промежуточное поло-



жение и играет связующую роль между мембраной, цитоскелетом и основной гиалоплазмой. К субмембранным компонентам поверхностного аппарата следует отнести периферическую при- мембранную часть цитоскелета с белками, обеспечивающими ее связь с мембраной.

Идея о существовании сложной структурной организации основной цитоплазмы эукариотных клеток была широко распространена в цитологии в конце XIX — начале XX в. Однако по мере углубления представлений об организации живой цитоплазмы большинство наблюдаемых на фиксированных и окрашенных препаратах структур было признано артефактами, и основную цитоплазму стали рассматривать как сложную коллоидную систему, не имеющую постоянных структурных компонентов. Элементы постоянного цитоскелета обнаруживались на светооптическом уровне лишь в специализированных метазойных клетках (например, тонофибриллы в шиповатых клетках эпидермиса) и у одноклеточных организмов. Строгие научные доказательства наличия сложного цитоскелета как универсальной структуры в матриксе эукариотных клеток появились лишь в эру электронно-микроскопических исследований. При этом наиболее детальные работы вначале были выполнены на культивируемых *in vitro* фибробластах — излюбленном модельном объекте общей цитологии.

В настоящее время исследования организации цитоскелета, его связь с поверхностным аппаратом клетки, процессами внутриклеточного транспорта и клеточной подвижности составляют одну из актуальных общецитологических проблем. Накоплено много данных об организации цитоскелета и его примембранной периферической части как на модельных объектах, так и на специализированных метазойных клетках. Углубляются и расширяются представления об организации цитоскелета в клетках растений и у одноклеточных организмов. Все это позволяет дать довольно обстоятельную характеристику общих закономерностей организации цитоскелета — структур матрикса цитоплазмы эукариотных клеток.

В наиболее полном виде он представлен тремя тесно взаимосвязанными, но достаточно индивидуализированными системами: 1) системой микрофиламентов (микрофибрилл), основу которой составляют чаще всего актиновые фибриллы толщиной 7 нм; 2) системой, основным компонентом которой являются тубулиновые микротрубочки диаметром 22—24 нм; 3) гетерогенной по белковому составу системой промежуточных филаментов диаметром около 10 нм.\*

\* Детальные исследования некоторых специализированных метазойных клеток, например мышечных, а также сравнительно-цитологический анализ клеток протистов и некоторых растений позволяют сейчас выделить четвертую, гетерогенную по происхождению цитоскелетную подсистему так называемых тонких филаментов диаметром <5 нм (см. ниже).



**Микрофибриллярная система, или система микрофиламентов.** Основным белком микрофибриллярной системы является актин молекулярной массой 42 кДа. Этот мономерный глобулярный белок имеет участки связывания двухвалентных катионов и нуклеотидов (в физиологических условиях это обычно ионы  $Mg^{2+}$  и АТФ).

Актины очень консервативные белки. В аминокислотных последовательностях этих белков у животных и простейших наблюдается меньше 5% различий. По биологическим свойствам и электрофоретической подвижности в клетках позвоночных выделяют три типа актинов —  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -актины. При этом  $\alpha$ -актин характерен для специализированных мышечных клеток, а  $\beta$ - и  $\gamma$  — неммышечные формы актина. У высших беспозвоночных не удается выявить различие между мышечным и неммышечным актинами.

Количество актиновых генов у разных объектов варьирует. Так, у дрожжей обнаружен только один актиновый ген, у дрозофиллы их шесть, у цыпленка, по-видимому, семь, у одного из круглых червей четыре, у мыши и человека до 30. Такие данные не очень многочисленны, так как в генетическом отношении изучен еще относительно небольшой круг объектов.

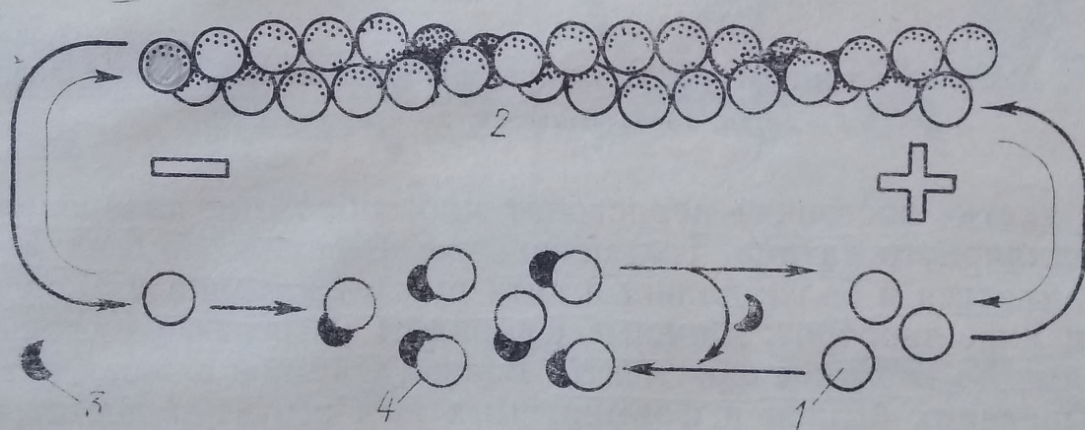


Рис. 7. Взаимоотношения глобулярного (G) и фибриллярного (F) актина. 1 — G-актин, 2 — F-актин, 3 — профиллин, 4 — комплекс G-актина с профиллином. Стрелками показано направление процесса сборки и разборки на «+»- и «-»-концах фибриллы.

Одно из основных свойств актина — способность к полимеризации и деполимеризации — превращению мономерной формы (G-актин — глобулярный актин) в полимерную (F-актин — фибриллярный актин) и обратно. Эти процессы достаточно сложны, многоступенчатые, требуют соблюдения ряда условий, но протекают в клетке с большой скоростью, что обеспечивает высокую лабильность микрофибриллярной системы. Процесс полимеризации начинается с образования тримеров (так называемой нуклеации). Следующий этап — элонгация — заключается в присоединении к обоим концам тримера новых молекул G-актина.



Формирование фибриллы актина — полярный процесс: на одном конце обмен мономеров происходит быстрее и критическая концентрация связанных с АТФ мономеров актина меньше, чем на другом. Этот конец получил название «+»-конец, а противоположный — «—»-конец актиновой фибриллы.

Ф-актин, или актиновая фибрилла, представляет собой двойную спираль из актиновых мономеров (рис. 7, 8) и содержит по крайней мере пять специфических участков, связанных с системой вспомогательных или актинсвязывающих белков: «+»- и «—»-концы фибриллы и не менее трех специфических участков на боковых поверхностях. Кроме того, существуют актинсвязывающие белки, которые взаимодействуют с G-актином и ингибируют либо нуклеацию (профиллин), либо нуклеацию и элонгацию (фрагмин). Вполне возможно, однако, что действуют еще какие-то, пока неизвестные механизмы регуляции полимеризации и деполимеризации актина, так как в большинстве эукариотных клеток присутствует избыточный фонд G-актина.

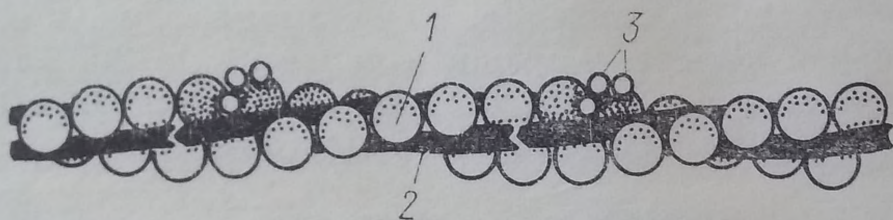


Рис. 8. Актиновая протофибрилла поперечно-полосатого мышечного волокна.  
1 — актин, 2 — тропомиозин, 3 — тропонины.

В клетке постоянно происходят многообразные превращения фибриллярного актина. Так, небольшие фибриллы актина могут объединяться в более длинные нити путем сшивания их конец в конец или, наоборот, длинные фибриллы разрезаются особыми белками на короткие фрагменты. Взаимодействия актина, актинсвязывающих белков и формируемых ими структур достаточно сложны и многообразны (рис. 9).

Существуют специальные белки, кэпирующие «+»-конец (гельзолин, виллин, фрагмин) или «—»-конец (акументин) фибриллы. Такие белки, как тропомиозин и филамин, приводят к стабилизации отдельных фибрилл. Большая группа актинсвязывающих белков обуславливает образование таких структур, как плотные или рыхлые пучки, а также переход цитоплазмы в гелеобразное состояние. Особое значение для осуществления механохимических процессов (внутриклеточного транспорта, клеточной подвижности) имеет взаимодействие немышечного актина с немышечным миозином. Наконец, специальные белки примембранного цитозоля и, по-видимому, интегральные белки мембран обеспечивают структурную связь отдельных актиновых фибрилл, сетей или пучков с мембраной. Такая связь может осуществляться либо через встроенные в мембрану вспомогательные



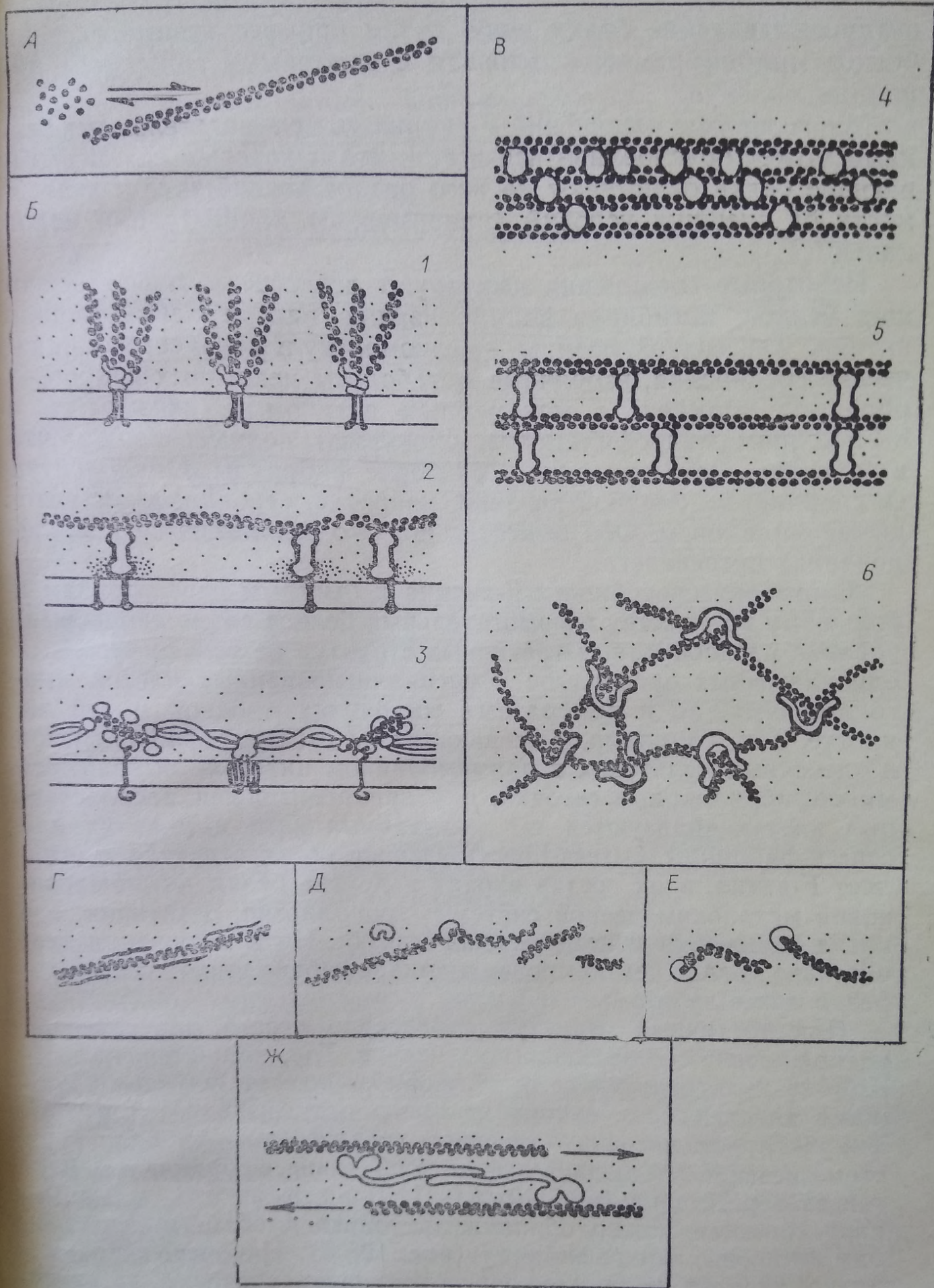


Рис. 9. Структуры, образуемые актином и актинсвязывающими белками. А — взаимопревращения О и F-актина; Б — взаимодействие F-актина с мембраной через винкулин, тензин и талин (1),  $\alpha$ -актинин (2) и спектрин (3); В — образование плотных (4), рыхлых (5) пучков и сетей (6); Г—Е — стабилизация (Г), фрагментация (Д) и копирование (Е) микрофибрилл; Ж — взаимодействие F-актина с миозином.



актинсвязывающие белки, либо путем прямого взаимодействия белков примембранного цитозоля с полярными головками липидных молекул.

Многообразие отношений F-актина со вспомогательными белками может обуславливаться и тем, что некоторые актинсвязывающие белки оказывают на него разное воздействие в зависимости от внешних условий (например, от концентрации ионов кальция).

Некоторые соединения имитируют действие актинсвязывающих белков, ингибируя полимеризацию или деполимеризацию актина. Так, цитохалазины — низкомолекулярные гетероциклические соединения, вторичные метаболиты некоторых грибов, образуют комплекс с мономерным актином и, связываясь с «+»-концом микрофиламента, блокируют полимеризацию, что в конечном счете приводит к разборке фибриллы. Циклопептид фаллоидин, яд бледной поганки, напротив, стабилизирует активные филаменты. Оба вещества широко используются в исследованиях цитоскелета.

Благодаря способности F-актина к быстрым перестройкам и большому количеству вспомогательных белков возможно формирование разнообразных третичных структур не только у разных одноклеточных организмов и специализированных клеток многоклеточных, но и при разных состояниях в одной и той же клетке. Так, например, у оседающих на субстрат фибробластов в клеточных культурах в примембранном цитозоле выявляются микрофибриллярные сеточки, а у прикрепившихся распластаных клеток образуются так называемые нити натяжения или стресс-фибриллы (stress-fibers). Основу обеих структур составляет F-актин, в их состав входят и другие белки актин-миозиновой механохимической системы: тропомиозин,  $\alpha$ -актинин, а в нитях натяжения и немышечный миозин. Нити натяжения значительно толще, чем компоненты микрофибриллярной сети и гораздо менее лабильны.

Для третичных структур характерно строго определенное расположение составляющих их белков. Так, например, при обработке культивируемых *in vitro* фибробластов флуоресцирующими антителами к актину на препаратах выявляется микрофибриллярная сеточка — сложное переплетение фибрилл, при этом свечение наблюдается и по всей длине фибрилл, и в местах их пересечения (рис. 10, А). С помощью антител к  $\alpha$ -актину свечение можно обнаружить только в области пересечения актиновых микрофибрилл (рис. 10, Б). Наконец, использование антител к тропомиозину вызывает свечение по длине микрофибрилл, но не в области их пересечения (рис. 10, В). Подобное взаимное расположение белков характерно и для миофибрилл мышечных клеток.

Другим основным белком микрофибриллярной системы является миозин. Миозины — это высокомолекулярные белки, ко-



которые, в отличие от актинов, характеризуются значительной вариабельностью как у представителей разных видов, так и в пределах одного организма. Однако, несмотря на большое количество разновидностей, молекулы миозина построены по единому принципу и состоят из палочковидной хвостовой части и двух

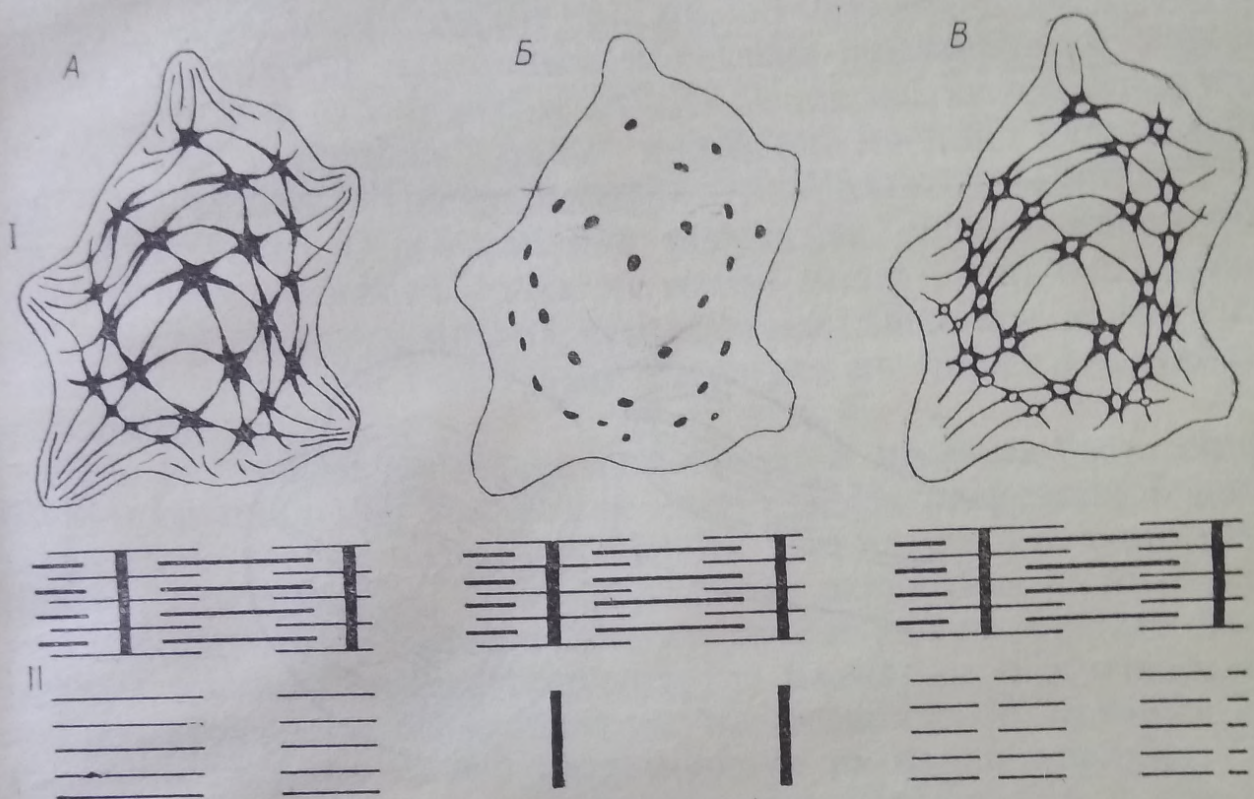


Рис. 10. Локализация белков микрофиламентов в субмембранном аппарате фибробластов (I) и в миофибриллах поперечно-полосатых мышц (II).

А — актин, Б —  $\alpha$ -актинин, В — тропомиозин.

глобулярных головок (рис. 11, А), образованных тяжелыми и легкими цепями молекулярной массой около 200 и 18 кДа соответственно. Аминокислотные последовательности тяжелой цепи составляют длинный  $\alpha$ -спиральный участок и глобулярную структуру, с которой ассоциируются легкие цепи;  $\alpha$ -спирали двух тяжелых цепей обвиваются одна вокруг другой и формируют палочковидный хвост. Таким образом, каждая глобулярная головка миозина содержит концевой отдел тяжелой цепи и две легкие цепи (рис. 11, Б). В головках сосредоточены два важнейших центра молекулы: АТФазный и центр связывания с актином. При действии протеолитических ферментов эта часть молекулы отщепляется, образуя так называемый тяжелый меромиозин, который может специфически взаимодействовать с актином. Это его свойство используется для определения полярности актиновых микрофибрилл в электронно-микроскопических исследованиях: при декорировании актиновых филаментов тяжелым меромиозином образуются структуры, напоминающие наконечники стрел (arrow heads). «Заостренный» конец микро-



филамента представляет собой «—»-конец, а «оперенный» — «+»-конец.

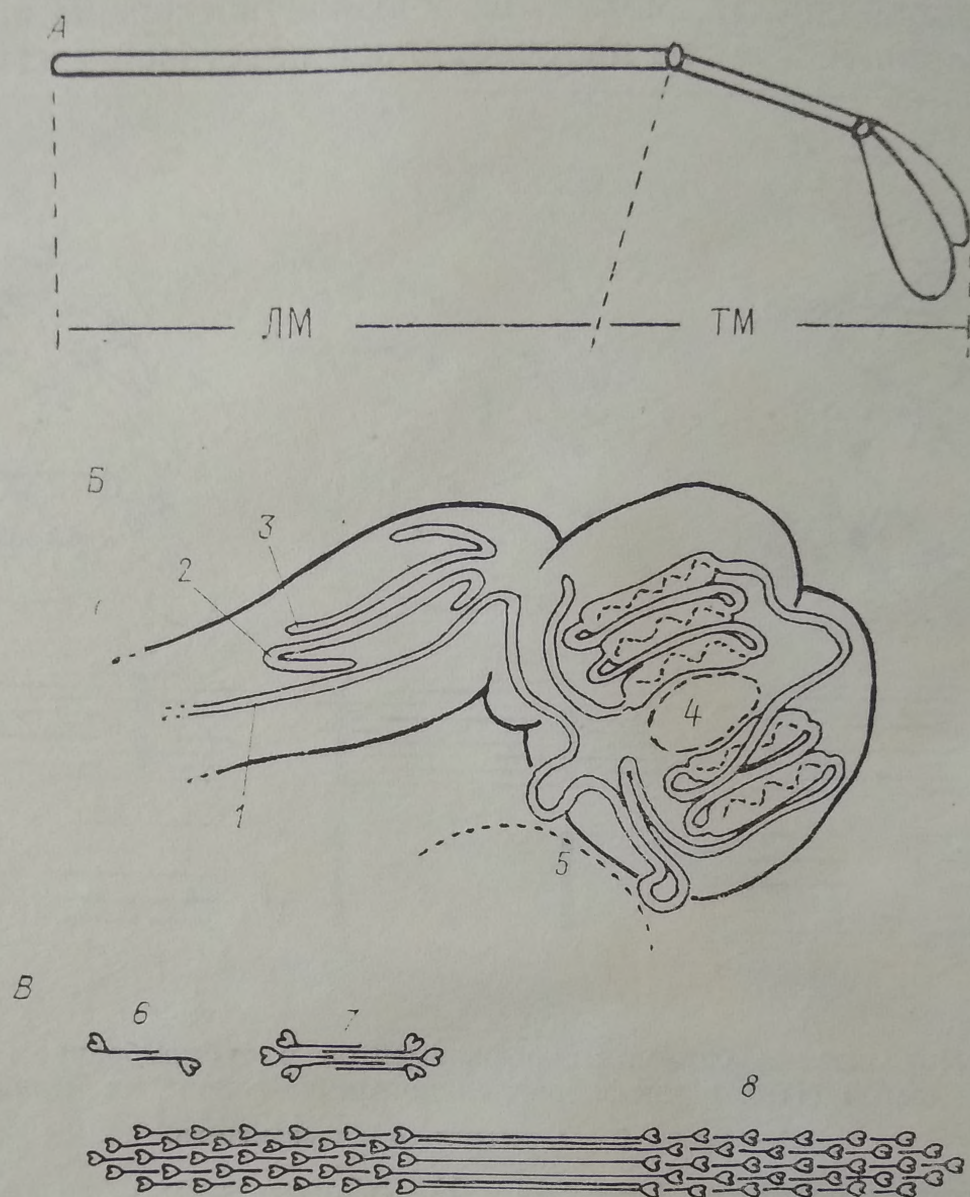


Рис. 11. Организация молекулы миозина.

А — общий вид, Б — строение головки, В — надмолекулярные комплексы. ТМ — тяжелый и ЛМ — легкий меромиозин. 1 — тяжелая и 2, 3 — легкие цепи молекулы; 4 — АТФазный и 5 — актинсвязывающий центры; 6 — димер; 7 — малый мономер; 8 — мышечная миозиновая протофибрилла.

У ряда простейших и в некоторых метазойных клетках удалось выявить своеобразную разновидность миозина — так называемый одноголовый миозин (миозин I), представляющий собой как бы половину описанной выше структуры — одну тяжелую цепь и две легкие.

В животных клетках различают два основных типа миозина — мышечный и немышечный. Мышечный миозин свойствен поперечно-полосатым мышцам позвоночных и беспозвоночных и гладким мышцам беспозвоночных. Немышечный миозин, как и следует из его названия, обнаруживается в самых разных клет-



ках, но характерен и для большинства гладких мышц позвоночных. |

Мышечный миозин в нативном виде и *in vitro* образует крупные протофибриллы, в которых молекулы миозина обращены своими палочковидными хвостами друг к другу, а головками — в противоположные стороны (рис. 11, В). Протофибриллы немышечного миозина построены так же, но они значительно короче; однако по некоторым данным молекулы немышечного миозина при сборке в протофибриллу *in vitro* располагаются по-другому и образуют сплошные ряды противоположной направленности. Одноголовый миозин вообще не способен собираться в протофибриллы. О механизмах регуляции сборки миозиновых протофибрилл известно пока не очень много. Так, палочковидные хвосты молекул многих немышечных миозинов могут складываться втрое и в таком виде молекула не может участвовать в сборке.

Для изучения взаимодействия актина и миозина были разработаны специальные модельные системы. Из разрезанной вдоль гигантской клетки водоросли *Nitella* или *Chara* удаляют цитоплазму, сохраняя при этом продольные актиновые тяжи одинаковой полярности. Затем в клетку вводят искусственные полимерные частицы, соответствующие по размерам различным цитоплазматическим образованиям, на поверхности которых закреплены головки миозиновых молекул из мышц кролика. Эти частицы взаимодействуют с актиновыми фибриллами и при добавлении АТФ начинают двигаться по их тяжу со скоростью, сходной со скоростью перемещения собственных цитоплазматических органелл. При добавлении частиц, покрытых другими миозинами, например миозинами мышцы моллюсков, движение происходило только в присутствии ионов кальция, т. е. на этой модели оказалось возможным изучать механизмы регуляции взаимодействия актина и миозина.

Разработан и способ количественного анализа взаимодействий актина и миозина: для этого молекулы миозина закрепляют неподвижно и регистрируют тянущую силу тяжей актина.

Все микрофибриллярные образования обеспечивают выполнение различных механохимических функций клетки (перемещение, эндо- и экзоцитоз, цитотомия и др.).

Актиновые и миозиновые микрофибриллы являются основными компонентами сократимых колец — специальных структур, которые образуются в животных клетках при цитотомии в области перетяжки и способствуют разделению дочерних клеток. Актин-миозиновая система играет важную роль и в процессе свертывания крови. Не вдаваясь в детали процесса, отметим лишь те моменты, которые касаются рассматриваемых вопросов. В кровяных пластинках млекопитающих, представляющих собой специализированные участки цитоплазмы гигантских клеток костного мозга — мегакариоцитов, и, наряду с другими ком-



понентами, обеспечивающих свертывание, существуют интересные взаимоотношения между актиновыми фибриллами и актин-связывающими белками. Зрелые кровяные пластинки содержат все компоненты, необходимые для механохимической работы актин-миозиновой системы. Однако на первых этапах свертывания крови актин и миозин оказываются разобщенными, и сложные изменения клеточной поверхности кровяных пластинок обуславливаются взаимодействием актина с другими актинсвязывающими белками (филамин, тропомиозин). Непосредственный контакт актина с миозином происходит лишь на поздних этапах процесса свертывания, при разрушении кровяных пластинок, когда в результате сокращения актин-миозиновой системы формируется плотный сгусток.

Интересные модификации в организации и работе надмолекулярных актиновых структур удалось обнаружить в сперматозоидах. Так, у голотурии из рода *Thyone* при развитии акросомной реакции в головке сперматозоида формируется длинный и толстый пучок актиновых фибрилл, который должен «проткнуть» желеобразное вещество, окружающее яйцеклетку, чтобы дать возможность мембранам половых клеток слиться. Образование этого пучка происходит путем «взрывной» полимеризации актиновых фибрилл из G-актина, фонд которого здесь чрезвычайно велик. В сперматозоидах мечехвоста этот же эффект достигается благодаря выпрямлению спирально закрученных актиновых фибрилл предсуществующего пучка.

Степень развития актиновых структур значительно варьирует в клетках разных животных. Так, в эпителии губы гребневика очень мощный пучок актиновых филаментов связывает ресничный и гладкомышечный аппараты этих клеток. А у *Trypanosoma brucei* актиновых филаментов обнаружить не удастся, хотя гены актина у нее есть. Возможно, это связано с генными мутациями, приводящими к аминокислотным заменам в области очень консервативного участка молекулы актина, ответственного за его полимеризацию (т. е. в месте расположения центра связывания с актином).

Интересные варианты организации микрофибриллярного компонента периферического цитоскелета обнаруживаются в поверхностном аппарате эритроцита и «щеточной каемке» — апикальной части всасывающей клетки кишечного эпителия млекопитающих. На этих излюбленных объектах общей цитологии можно продемонстрировать бурный прогресс в исследовании цитоскелета.

Если в конце 70-х годов наши сведения о субмембранном аппарате эритроцитов млекопитающих ограничивались лишь приблизительными данными о его белковом составе, в частности о наличии спектрина — белка, как тогда считали, уникального для эритроцитов, то в настоящее время мы располагаем подроб-



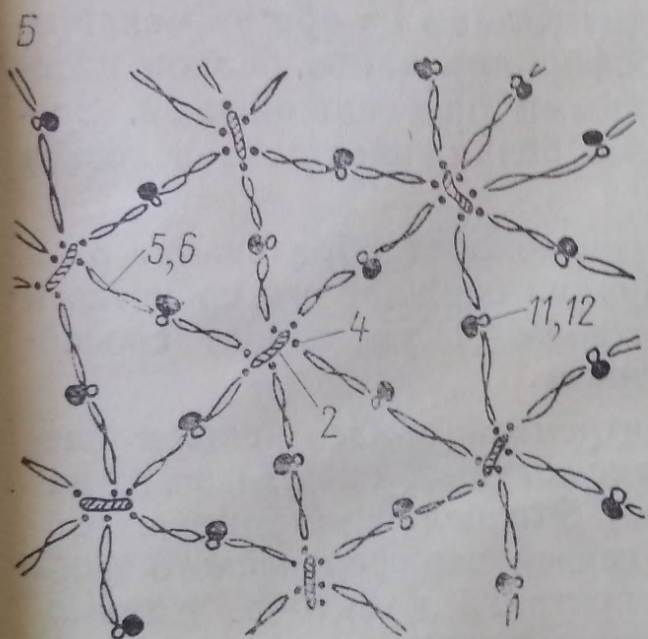
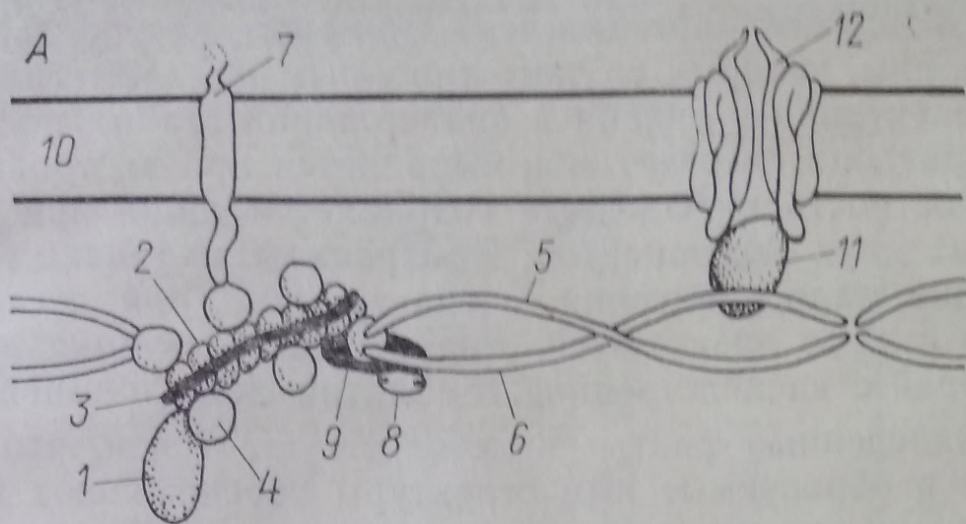


Рис. 12. Локализация белков в периферическом цитоскелете эритроцита на поперечном (А) и тангентальном (Б) срезах.

1 — белок В14,1; 2 — актин; 3 — тропомиозин; 4 — белок В14,9; 5 —  $\alpha$ - и 6 —  $\beta$ -субъединицы спектрина; 7 — гликофорин; 8 — кальмодулин; 9 — аддуцин; 10 — плазматическая мембрана; 11 — анкирин; 12 — Вd3-гликопротеин.

ной информацией о структуре этой системы, ее связях с мембраной и взаимоотношениях всех ее частей (рис. 12).

Основным белком субмембранного аппарата эритроцита является спектрин. На его долю приходится около 70% всех белков цитоскелета. Спектрин эритроцитов представлен гетеродимерными молекулами, образованными длинными  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепями молекулярной массой соответственно 240 и 220 кДа. Димеры спектрина объединяются в тетрамерные структуры, образуя перекладины сети цитоскелета длиной 200 нм. На концах тетрамеров спектрина находятся короткие (13—18 нм) фибриллы актина с димерами тропомиозина и особыми белками Вd4,1 и Вd4,9, которые объединяют тетрамеры в единую сеть (рис. 12, А). Кроме того, белок Вd4,1 связан с цитоплазматическим доменом интегрального белка мембраны гликофорина. Субмембранная сеть цитоскелета связана с мембраной эритроцита и через особый белок анкирин, который имеет сайты связывания



как с определенным участком  $\beta$ -цепи молекулы спектрина, так и с белком Bd3-гликопротеином — димерным интегральным белком мембраны, который служит анионным каналом (рис. 12, Б).

Роль спектрина и актина в поддержании стабильности цитоскелета эритроцитов отчетливо выявляется при экстракции белков — целостность цитоскелета сохраняется лишь при наличии в нем этих двух компонентов. Эритроциты мутантных мышей, содержащие мало спектрина, очень хрупкие, они легко разрушаются и быстро лизируются. Аналогичная ситуация наблюдается у людей с наследственной гемолитической анемией.

Все приведенные факты свидетельствуют о том, что именно эти белки и образуемые ими структуры обеспечивают эластичность и прочность поверхностного аппарата эритроцитов.

Существует несколько возможностей регулировать взаимосвязи компонентов этой системы, что в значительной степени определяет ее механические свойства. Одним из общих механизмов такой регуляции является фосфорилирование белков цитоскелета, осуществляемое специальными протеинкиназами. Этому процессу могут подвергаться все белки, входящие в состав цитоскелета, кроме актина.

Фосфорилирование спектринов ингибирует образование  $\alpha$ - и  $\beta$ -димеров, фосфорилирование анкирина снижает его сродство к спектриновым олигомерам, а белка Bd4,1 уменьшает способность спектрина связываться с актином.

В поверхностном аппарате эритроцита обнаружены и специальные регуляторные белки, среди которых прежде всего надо назвать кальмодулин и аддуцин. Эти белки регулируют образование одной из центральных связей периферического фибриллярного цитоскелета — связь спектрина и актина. Кальмодулин способствует сборке спектриновых молекул на актиновых филаментах, а комплекс аддуцина и кальмодулина ингибирует этот процесс при избытке ионов кальция.

Наши познания о периферическом цитоскелете апикальной части всасывающих клеток кишечного эпителия млекопитающих в 70-е годы сводились к констатации того факта, что в микроворсинках существуют мощные пучки актиновых фибрилл, связанных как с мембраной, так и между собой с помощью актинсвязывающих белков, а в апикальной части клетки присутствуют кератиновые промежуточные филаменты и немышечный миозин. К настоящему времени в цитоскелете микроворсинок идентифицированы три разновидности актинсвязывающих белков. Особенно интересен белок, связывающий пучки актиновых фибрилл с мембраной — это так называемый одноголовый миозин (миозин I). В апикальной части клеток помимо обычного миозина и горизонтальных пучков актиновых фибрилл (свободных и связанных с поясковой десмосомой) обнаружена еще система тонких волокон, построенных из белка фодрина — анало-



та спектрина. Все эти структуры связаны с хорошо развитой здесь системой промежуточных филаментов (рис. 13).

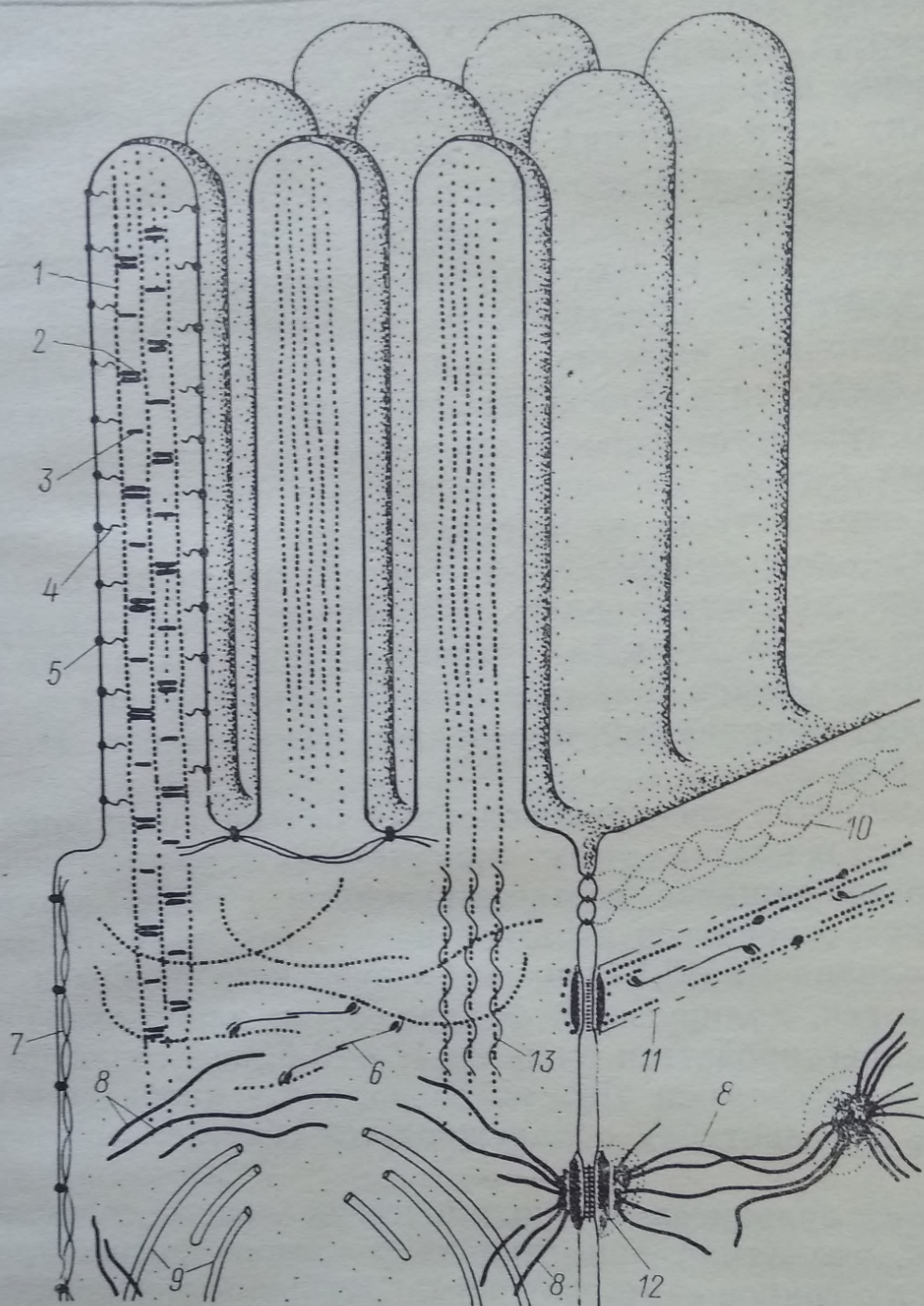


Рис. 13. Локализация белков в цитоскелете микроворсинок всасывающих клеток кишечного эпителия.

1 — актин; 2 — villin; 3 — fimbrin; 4 — 110 кДа (одноголовый миозин); 5 — 200 кДа; 6 — миозин; 7 — fodrin; 8 — промежуточные филаменты; 9 — микротрубочки; 10 — интегральные белки, формирующие изолирующий контакт; 11 — актиновые фибриллы в области опоясывающей десмосомы; 12 — точечная десмосома; 13 — тропомиозин.

Рассмотренные примеры организации двух относительно постоянных цитоскелетных субсистем представляют особый интерес, поскольку такого рода структуры широко распространены у эукариот. Например, белок анкирин образует специфические контакты не только с Bd3 — интегральным белком мембраны эритроцита, но и с белками, образующими анионные каналы в клетках эпителия почки, с белками натриевых каналов в нерв-



ных клетках и, наконец, с такими универсальными белковыми комплексами, как белки K, Na-АТФазы. Эти три типа белков не гомологичны, однако обладают общей особенностью — наличием больших цитоплазматических участков, с которыми и образует прочную связь анкирин.

Не менее интересные данные получены в сравнительно-цитологических исследованиях и о распространении спектрина. Выяснилось, что он или его аналоги присутствуют в субмембранном цитоскелете многих метазойных клеток, правда не в таких количествах, как в субмембране эритроцитов. Спектрины из разных клеток не идентичны и пока имеют разные названия: белок «щеточной каемки» TW-протеин (terminal web protein), фодрин, филамин и многие другие. Однако несомненно, что все это одно семейство вспомогательных спектриноподобных цитоскелетных белков, обеспечивающих в конечном счете эластичность псверхностного аппарата. Все они построены по одному принципу — это димеры  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей, имеющие тенденцию к формированию тетрамерных комплексов;  $\alpha$ -субъединица молекулярной массой 240 кДа — структура общая для всех спектриноподобных белков, а  $\beta$ -субъединица варьирующей молекулярной массы, по-видимому, определяет специфичность этих белков цитоскелета.

Большинство спектриноподобных белков кодируется разными генами; в клетках могут присутствовать разные типы спектрина, кодирующиеся соответствующими генами, которые могут экспрессироваться в разное время. Так, в кишечном эпителии цыпленка на 13-й день эмбрионального развития экспрессируется ген, кодирующий фодрин, а ген для белка TW начинает экспрессироваться лишь на 17—18-й день развития. Исследование миогенеза *in vitro* показало, что у миобластов имеется фодрин, а в миотубах обнаруживается спектрин эритроцитарного типа.

Анализ сравнительно-биохимических данных позволяет заключить, что самая примитивная и широко распространенная форма спектринов — это фодрины. Спектрины эритроцитарного типа представляют собой наиболее специализированные белки.

Еще одна принципиальная и интересная особенность обнаружена во взаимоотношениях спектрина с мембраной. Оказалось, что если в эритроцитах млекопитающих эта связь осуществляется в основном через анкирин, то часть спектриноподобных белков нервных клеток способна непосредственно взаимодействовать с интегральными белками мембран. При этом сайты связывания с этими белками в цепи спектрина не те, что для присоединения анкирина. Возможно, такая связь отражает эволюционно более древние, первичные отношения спектрина и мембраны.

Широко распространены в эукариотных клетках и описанные выше регуляторные белки и, в первую очередь, кальмоду-



лин. Это один из наиболее древних регуляторных кальцийсвязывающих белков. Он участвует во многих процессах, регулируя, в частности, деятельность многочисленных ферментных систем. Его структура и свойства хорошо изучены; выявлен целый класс сходных по организации белков, различающихся лишь количеством кальцийсвязывающих участков (от 1 до 4 — тропонин С, обелин, S-100).

Тубулиновая система, или система микротрубочек. У тубулиновой системы цитоскелета много общего с рассмотренной выше системой микрофиламентов, что определяется, по-видимому, не общностью их происхождения, а сходством закономерностей организации надмолекулярных структур.

Основной белок микротрубочек — тубулин молекулярной массой 50 кДа. У всех эукариотных клеток он представляет собой гетеродимер, состоящий из молекул  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулина, близких по аминокислотным последовательностям.

Тубулины относятся, наряду с гистонами и актином, к весьма консервативным и, по-видимому, очень древним белкам эукариотных клеток. При этом  $\beta$ -тубулин несколько более вариабелен, чем  $\alpha$ -тубулин. В геноме большинства организмов гены  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулина могут быть диффузно рассеяны по геному, у других — например, трипаносомы, они собраны в tandemные повторы — кластеры.

Количество тубулиновых генов у разных организмов может варьировать. Например, у цыпленка и дрозофилы имеется по 4 гена для  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулина, у морского ежа — по 13.

Молекулы тубулина подвергаются различным посттрансляционным изменениям:  $\alpha$ -тубулин фосфорилируется и ацетилируется,  $\beta$ -тубулин тирозинилируется и детирозинилируется. Экспрессия генов  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулинов отличается в разных клетках одного организма и может меняться в ходе онтогенеза в одних и тех же типах клеток.

Гетерогенность микротрубочек, таким образом, может определяться экспрессией различных тубулиновых генов, посттрансляционными модификациями белка и сочетанием этих явлений. Так, например, в геноме цыпленка имеются четыре  $\beta$ -тубулиновых гена, а по биохимическим критериям выявляется двенадцать различных  $\beta$ -тубулинов.

Одним из наиболее характерных и важных для клеток свойств тубулинов является их способность к обратимой полимеризации — формированию в физиологических условиях из пула димеров системы микротрубочек и их разборке. Молекулы тубулина, как и молекулы актина, имеют сродство к ионам  $Mg^{2+}$  и молекулам нуклеотидов (правда, вместо АТФ и АДФ молекулы тубулина связываются с ГТФ и ГДФ). Микротрубочки формируются в результате сложного многоэтапного процесса полимеризации тубулина. Сначала образуются высокомолекулярные затравки — олигомеры тубулина, содержащие несколько десят-



ков молекул. Затем происходит надстраивание затравок с формированием плоской пластинки из 13—14 рядов строго ориентированных димеров тубулина, которая по мере удлинения, постепенно, сворачивается в трубочку. При полимеризации происходит гидролиз ГТФ, однако кроме гидролизующейся молекулы в состав каждого тубулинового димера входит еще одна прочно связанная с ним молекула ГТФ, роль которой еще не выяснена.

При образовании микротрубочек молекулы тубулина объединяются в нитевидные структуры — протофиламенты, в которых  $\beta$ -тубулин предшествующего димера контактирует с  $\alpha$ -тубулином следующего. В соседних протофиламентах тубулиновые мономеры расположены в шахматном порядке. Типичная микротрубочка — это довольно длинный полый цилиндр, стенка которого построена чаще всего из тринадцати параллельно уложенных и продольно ориентированных протофиламентов (рис. 14).

Микротрубочки, так же как и актиновые микрофибриллы, представляют собой полярные структуры — у них различают «+»- и «-»-концы. На «+»-конце обмен тубулиновых димеров идет быстрее и критическая концентрация димеров меньше, чем на «-»-конце.

Полярность микротрубочек связана, по-видимому, с закономерной ориентацией тубулиновых димеров.

В электронно-микроскопических исследованиях полярность микротрубочек можно определить, декорируя их белком динеином, изолированным из аксономы ресничек (см. ниже). Молекулы динеина связываются со стенкой микротрубочки под некоторым углом, образуя при этом характерную структуру как на продольных, так и на поперечных срезах. Напомним, что подобным образом определяют и полярность актиновой микрофибриллы при обработке ее тяжелым меромеозином. Кроме того, при определенных условиях тубулин способен полимеризоваться на стенках предсуществующих микротрубочек, образуя искривленные пластинки по всей длине микротрубочки. На поперечных срезах они выглядят как крючки, загнутые либо по часовой стрелке, либо против нее, что и определяет отношение структуры к микротрубочкоорганизующему центру, т. е. полярность микротрубочки.

Как правило, микротрубочки в пределах одной клетки имеют одинаковую полярность: быстро растущие «+»-концы микротрубочек ориентированы дистально по отношению к так называемым микротрубочкоорганизующим центрам (МТОЦ или ЦОМТ) — уплотненным участкам цитоплазмы, расположенным либо в области клеточных центров, либо диффузно по всей цитоплазме; «-»-конец микротрубочки оказывается экранированным благодаря закориванию в МТОЦ, что, как и в микрофибрилярной системе, блокируя разборку на «-»-конце, способствует росту микротрубочки. Такая ориентация микротрубочек прослеживается у растений и животных (от простейших до мле-



копитающих) и указывает на эволюционную консервативность клеточных механизмов, контролирующих их закономерную сборку.

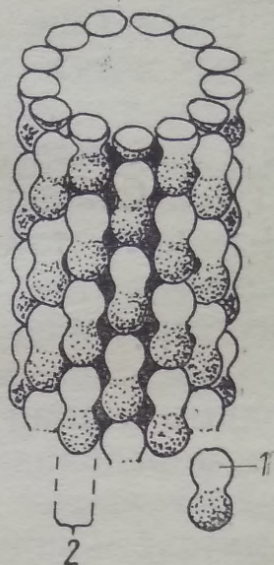


Рис. 14. Организация микротрубочки.

1 — тубулиновый димер, состоящий из  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулина; 2 — протофиламент стенки микротрубочки.

При исследованиях биохимического состава МТОЦ выявлен ряд специфических белков, в частности  $\gamma$ -тубулин, отличающийся от  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулинов по аминокислотным последовательностям; характерна для них, по-видимому, и специфическая РНК.

Изолированные из клетки МТОЦ индуцируют полимеризацию микротрубочек *in vitro*.

Микротрубочкоорганизующие центры претерпевают очень сложные морфологические и биохимические изменения при переходе клеток к митозу. Так, у диатомовых водорослей МТОЦ, представленный в интерфазе единичной структурой, в профазе митоза преобразуется в две пластинки, являющиеся центрами образования правильно расположенных антипараллельных микротрубочек митотического аппарата (подробнее см. ниже).

В экспериментах *in vitro* было обнаружено следующее явление: при полимеризации очищенного тубулина в определенных условиях оба конца микротрубочки то растут, то быстро разбираются (эти процессы на «+»-конце идут быстрее, чем на «-»-конце), т. е. все время происходят изменения длины микротрубочки. Это свойство было названо динамической нестабильностью; ее, по-видимому, можно объяснить следующими причинами: димеры тубулина, связанные с ГТФ, имеют большее сродство к тубулиновому полимеру, чем молекулы, несущие ГДФ; при этом сама полимеризация идет быстрее, чем гидролиз связанного с тубулином ГТФ. В результате на конце растущей микротрубочки образуется «шапочка» из молекул тубулина, связанных с ГТФ, что в свою очередь будет индуцировать присоединение новых и новых ГТФ-несущих димеров. Если же в силу каких-либо причин эта шапочка утрачивается (т. е. на конце микротрубочки находятся молекулы тубулина, связанные с



ГДФ), то микротрубочка начнет быстро деполимеризоваться. Это явление можно непосредственно наблюдать в световом темнопольном микроскопе с применением «видеоусилительной» установки.

Вследствие динамической нестабильности микротрубочки в клетке могут существовать в течение более-менее длительного времени только, если их концы защищены от деполимеризации. Как говорилось выше, «—»-конец микротрубочек заякорен в МТОЦ. Стабильность микротрубочки зависит от того, будет ли «+»-конец также закреплен каким-либо образом — например, «пойман» той или иной клеточной структурой. Большинство микротрубочек цитоплазмы эукариотных клеток весьма динамичные образования — в клетке непрерывно идут процессы их полимеризации и деполимеризации. Концы микротрубочек растут и разбираются с большой скоростью. Период полужизни микротрубочек в интерфазе клетки составляет около 10 мин, в митозе — значительно меньше.

Регуляция поведения микротрубочек может быть связана со многими факторами, в том числе фосфорилированием и дефосфорилированием ряда белков, изменением концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , незначительное повышение которой вызывает деполимеризацию микротрубочек. Регуляция этих процессов достаточно сложна; так, одна и та же структура (например, кинетохор, см. ниже) может индуцировать и полимеризацию, и деполимеризацию микротрубочек в разных фазах жизненного цикла клеток.

Существует ряд соединений, блокирующих процессы полимеризации и деполимеризации. Растительный алкалоид колхицилин и его аналоги связываются с тубулиновым димером и «+»-концом микротрубочки, прекращая полимеризацию. Другое вещество — таксол, напротив, стабилизирует микротрубочки, препятствуя деполимеризации.

Организация процессов полимеризации — деполимеризации и соотношение между ними в тубулин-динеиновой системе в общем аналогичны организации этих процессов в системе актиновых микрофиламентов. Такое сходство в организации принципиально важных процессов в различных по происхождению и функциональному значению системах, очевидно, не случайно и определяется общей задачей создания достаточно динамичного и способного к существенным перестройкам цитоскелета.

Ярким примером использования в жизнедеятельности животных способности микротрубочек к быстрой полимеризации и деполимеризации могут служить аксоподии солнечников. Каждая аксоподия содержит несколько сотен упорядоченно расположенных микротрубочек, образующих так называемую аксонему. Солнечник приобрел способность передвигаться, как бы перекатываясь по субстрату за счет быстрой деполимеризации микротрубочек в одних аксоподиях и полимеризации — в других. Как в клетках разных организмов, так и в одной и той же



клетке, могут существовать микротрубочки, различающиеся по степени чувствительности к внешнему воздействию. Например, часть микротрубочек нервных клеток головного мозга особенно устойчива к повышению температуры. Как правило, микротрубочки клеток животных более чувствительны к колхицину, чем микротрубочки высших растений, грибов и протистов. Особенно высокой стабильностью отличаются все три типа микротрубочек трипаносом (веретено деления, жгутик, субпелликулярные микротрубочки поверхностного аппарата).

Причины разной стабильности микротрубочек до конца неясны. Вероятно, это обусловлено как различиями в составе вспомогательных белков (см. ниже), так и посттрансляционными изменениями тубулина. Например, у трипаносомы есть ферменты, которые могут либо отрезать концевой тирозин от молекулы  $\alpha$ -тубулина, либо присоединять его. При этом субстратом для первого процесса служит тубулин в составе микротрубочек, а для последнего — в форме димеров (аналогия с комплексом профиллин — актин). Детирозинилированные микротрубочки как будто более стабильны. Во всяком случае, в период формирования жгутика и субпелликулярного цитоскелета при делении трипаносом новообразующиеся микротрубочки содержат тирозинилированный тубулин, а впоследствии, по мере завершения сборки этих структур, количество тирозинилированного тубулина в микротрубочках резко уменьшается. Однако подобные процессы (тирозинилирование — детирозинилирование), по-видимому, не универсальны. Так, у миксомицета *Physarum polycephalum* и инфузории стилонихии концевым остатком у  $\alpha$ -тубулина является не тирозин, а метионин.

В настоящее время помимо основной цитоплазматической массы тубулина, входящего в состав фонда димеров и различных типов микротрубочек, у эукариотных клеток обнаружена и мембранная форма тубулина. Она иногда обнаруживается в нервных клетках позвоночных, в стенках окаймленных пузырьков и в комплексе с миелином.

Возможно, что мембранный тубулин участвует в образовании связей микротрубочек с мембраной или во всяком случае обеспечивает взаимодействие компонентов периферического субмембранного цитоскелета с основным цитоскелетом клетки.

Принципиальное сходство организации систем актиновых микрофиламентов и тубулиновых микротрубочек проявляется и в наличии в последней большого количества вспомогательных белков. Они изучены пока менее подробно, чем сходные по функции белки актиновой системы, но уже сейчас ясно, что по количеству, многообразию и сложности взаимоотношения с микротрубочками не уступают, а возможно и превосходят белки микрофибриллярной системы.

Помимо белков, кэпирующих концы микротрубочек и способствующих начальным этапам нуклеации (например, белки



МТОЦ), выделены еще две группы белков, связанных с боковой поверхностью микротрубочек: это относительно низкомолекулярные (55—70 кДа)  $\tau$ -белки и высокомолекулярные, известные как МАР (microtubule-associated proteins — от 270 до 350 кДа). Молекулы этих тканеспецифичных белков имеют палочковидную форму. Они образуют структуры в виде шипов и выступов на поверхности микротрубочек и служат как для связи микротрубочек между собой и с другими системами цитоскелета или мембранными органоидами, так и для стабилизации микротрубочек (по аналогии со стабилизирующими белками микрофиламентной системы). Наиболее консервативный из них — МАР-2. Связь с белками МАР, как правило, обеспечивает наиболее вариабельный С-конец  $\beta$ -тубулина.

По-видимому, МАР играют важную роль в процессах полимеризации микротрубочек, стабилизируя затравки из олигомеров тубулина. Так, *in vitro* очищенный тубулин (без МАР) полимеризуется значительно хуже, чем в присутствии МАР.

Один из основных белков микротрубочковой системы — динеин; эту систему часто называют тубулин-динеиновой (по аналогии с актин-миозиновой микрофибриллярной системой).

Высокомолекулярный динеин отвечает за механохимическую функцию микротрубочек. Он был обнаружен в аксонах ресничек, в составе так называемых динеиновых «рук» — постоянных компонентов ресничек и жгутиков (см. ниже). Впоследствии была обнаружена и цитоплазматическая форма динеина. Существует два типа молекул динеина — двухголовые и трехголовые. Каждая субъединица, участвующая в построении молекулы, состоит из одной тяжелой цепи 300—350 кДа и 1—10 легких и промежуточных цепей (10—30 и 30—200 кДа соответственно).

Цитоплазматический динеин отличается от реснично-жгутикового в основном составом легких и промежуточных цепей, которые, по-видимому, ответственны за контакт либо с другими микротрубочками, либо с мембранными органоидами цитоплазмы.

В настоящее время на ряде моделей (аксонах нервных клеток, меланофорах, гигантской амебе и др.) убедительно показано, что за транспорт органелл от «+»-конца к «—»-концу микротрубочек (обычно в дистальном от перикариона направлении) ответствен цитоплазматический динеин. В противоположном направлении мембранные органоиды транспортируются белком кинезином (370—800 кДа), состоящим из тяжелых и легких цепей и отличающимся от динеина конфигурацией молекулы.

Кроме того, обнаружен механохимический фермент (высокомолекулярный белок с АТФазной активностью), который может осуществлять движение по микротрубочкам в обоих направлениях. Выявлен также белок динамин, отвечающий за транспорт по микротрубочкам мембранных органоидов в направлении от «—»-конца к «+»-концу. Все эти белки работают, вероятно, по



тому же принципу, что и миозин и реснично-жгутиковый динеин, однако вопрос этот в отношении цитоплазматических механохимических белков микротрубочкового цитоскелета изучен еще недостаточно.

Таким образом, тубулин-динеиновая система эукариотных клеток (как и актин-миозиновая) выполняет механохимические функции; однако при этом микротрубочки играют роль и организующей части цитоскелета, что особенно важно для обеспечения процессов транспорта и четко проявляется в поляризованных клетках.

Помимо временных, быстро перестраивающихся микротрубочек, в специализированных метазойных клетках и клетках-организмах протистов широко распространены и более стабильные микротрубочковые системы. К ним относятся, например, образованные скелетными микротрубочками ядерных эритроцитов позвоночных и кровяных пластинок млекопитающих специальные кольца по периферии этих тканевых структур. Часто встречается сложно устроенный микротрубочковый постоянный цитоскелет в поверхностном аппарате инфузорий и некоторых других одноклеточных организмов.

Другим классическим примером постоянной субмембранной системы может служить тубулин-динеиновая система аксонемы ресничек и жгутиков. Ее основным компонентом являются микротрубочки, организованные в пучок таким образом, что девять пар периферических микротрубочек, или дублетов, окружают две одиночные центральные микротрубочки (рис. 15, А, Б) — так называемая структура  $9+2$ . Так же, как и в нестабильных субмембранных системах, они состоят из димеров тубулина, расположенных в шахматном порядке. Лишь в местах контактов микротрубочек А и Б, образующих дублет, такой порядок нарушается, и в трех рядах общих для этих микротрубочек протофиламентов прослеживается линейное расположение  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулиновых глобул в димерах.

Второй основной белок аксонемы ресничек и жгутиков — динеин. Он сосредоточен в так называемых наружных и внутренних динеиновых «руках» (рис. 15, Б) — структурах, расположенных по всей длине трубочки А на определенных расстояниях друг от друга и образующих временные контакты со стенкой микротрубочки соседнего дублета. В наружных и внутренних «руках» локализуются разные изоформы динеина. Исследуя некоторые мутантные формы ресничек, удалось показать, что наружные «руки» отвечают за частоту биения, а внутренние — за его амплитуду. Правда, данные, полученные на других формах, указывают на то, что отношения здесь более сложные.

Вся эта механохимическая система стабилизируется в ресничках и жгутиках фибриллярными белковыми структурами, среди которых особое значение имеют опорный цилиндр вокруг пары центральных микротрубочек и радиальные структуры, рас-



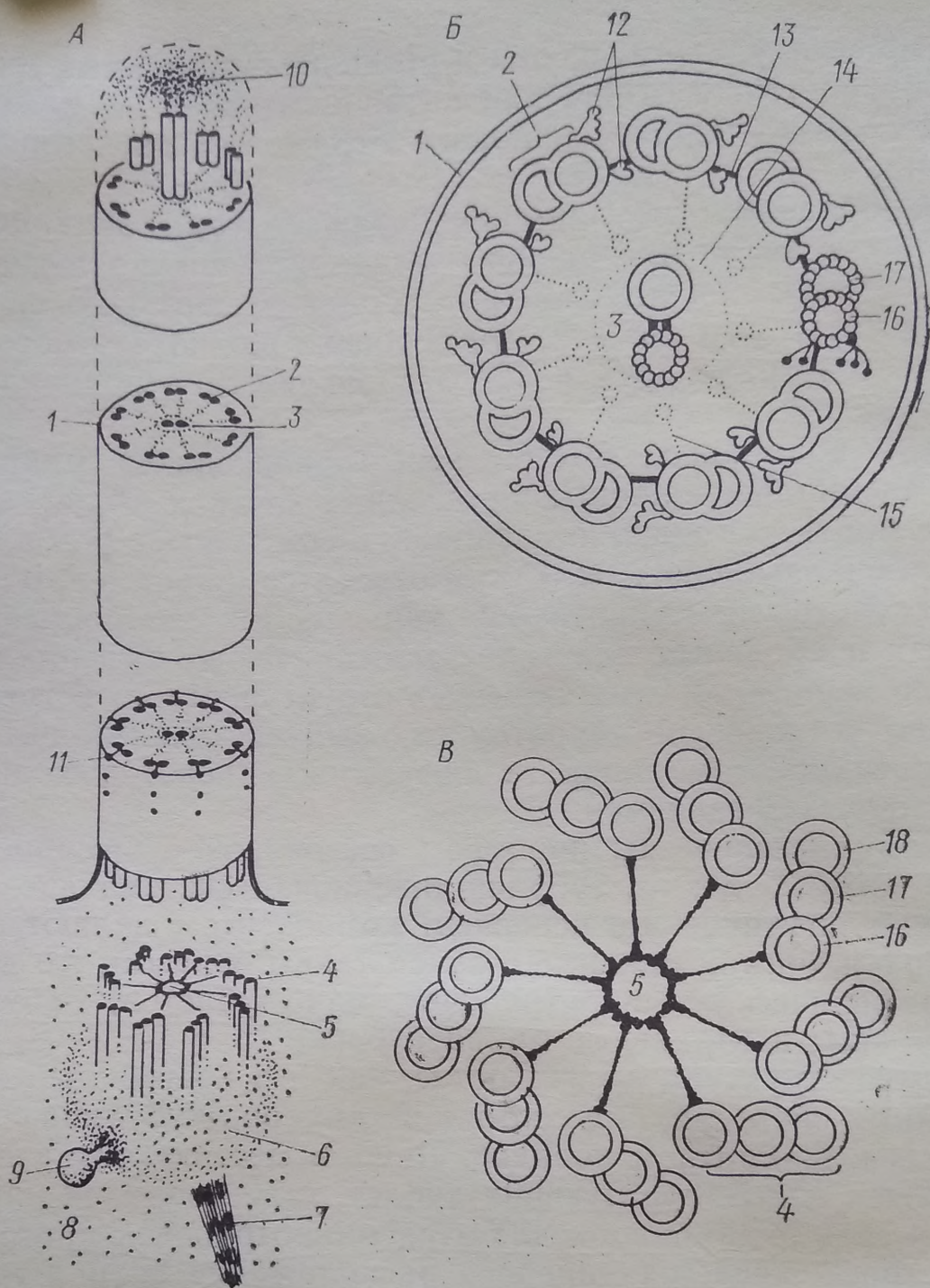


Рис. 15. Организация реснички.

А — общая схема; Б, В — поперечные срезы на уровне аксонемы (Б) и базального тельца (В). 1 — плазматическая мембрана; 2 — периферические и 3 — центральные дублеты микротрубочек; 4, 5 — триплеты микротрубочек (4) и центральный цилиндр (5) базального тельца; 6 — гало; 7 — корневая нить; 8 — цитоплазма клетки; 9 — сателлит; 10, 11 — аппарат крепления микротрубочек к мембране в дистальной (10) и проксимальной (11) частях аксонемы; 12 — динеиновые руки; 13 — нексин; 14 — центральная капсула; 15 — радиальные спицы; 16—18 — периферические микротрубочки А (16), В (17) и С (18).

полагающиеся на определенном расстоянии друг от друга и связывающие центральный опорный цилиндр с периферическими дублетами микротрубочек (рис. 15, Б). Радиальные структуры и центральный цилиндр образованы фибриллярным белком нексином. В настоящее время в составе аксонемы выделяют более ста различных белков.



В основании ресничек формируется базальный аппарат (рис. 15, В). Его универсальная постоянная структура — базальное тельце. Оно представляет собой цилиндр, стенки которого состоят из девяти триплетов микротрубочек. Причем две микротрубочки в каждом триплете связаны с периферическими микротрубочками ресничек через систему перпендикулярных к длинной оси реснички электронно-плотных дисков. Что касается центральных микротрубочек ресничек, то одна из них обычно короче другой и заканчивается свободно в гиалоплазме, не доходя до вещества дисков базального аппарата. Вторая же заканчивается в особой шаровидной структуре, находящейся в центре апикального диска. В основании реснички над областью расположения дисков базального аппарата наблюдается несколько рядов сложных конусовидных структур, которые осуществляют связь периферических микротрубочек с мембраной. Два ряда аналогичных структур наблюдаются и в области апикальных дисков. К цилиндру базального тельца реснички подходит специальная цистерна, ограниченная мембраной. Как правило, базальный аппарат имеет и сателлит — шаровидную структуру, связанную с ним ножкой.

В проксимальной части базального тельца от него отходят одна или несколько корневых нитей, или корешков, обладающих поперечной исчерченностью и представляющих собой пучки тонких фибрилл (каждая толщиной около 5 нм). Корневые нити могут тянуться от базального тельца до ядра, а иногда достигают и базальной части клетки.

Специальный аппарат формируется и на апикальном конце реснички. Центральные микротрубочки связываются с периферической мембраной через систему горизонтальных дисков и так называемую «шапочку», имеющую боковые выросты, непосредственно контактирующие с мембраной. Периферические микротрубочки заканчиваются особой структурой, образованной мощными пучками филаментов, идущими в двух направлениях: один идет к апикальному концу реснички параллельно мембране (от этого пучка отходят короткие поперечные мостики, непосредственно контактирующие с мембраной); второй, короткий, пучок вдается в просвет микротрубочки А.

Базальный аппарат ресничек инфузорий представляет собой наиболее сложный вариант дифференцировки рассматриваемой структуры. Здесь отчетливо проявляется тесная связь постоянной субмембранной механохимической системы поверхностного аппарата с мембранными структурами. Помимо регуляторной роли в функционировании механохимической системы базальный аппарат играет главную роль и в процессе формирования ресничек.

Морфогенетическая функция базального аппарата как центра самосборки сократимых и опорных структур хорошо показана на протистах при регенерации ресничек после их удаления. Так,



например, при действии на клетки хламидомонад или тетрахи- мен повышенного давления происходит либо сбрасывание рес- нишки, либо «втягивание» ее под мембрану; в цитоплазме микро- трубчатые структуры реснички разбираются до димеров ту- булина. При возвращении клетки в нормальные условия наблю- дается восстановление структуры реснички. Вначале в непо- средственной близости от мембраны определенным образом рас- полагается базальное тельце, затем на его апикальном конце вырастает ресничка. Процесс этот идет достаточно быстро и неза- висимо от синтеза белка, так как материалом для образования данной структуры служит фонд тубулина и сопутствующих бел- ков, а способом — самосборка, индуцированная базальным тель- цем.

Характерная для ресничек инфузорий организация постоян- ных тубулин-динеиновых механохимических систем с двумя центральными и девятью периферическими парами микротру- бочек имеет широкое распространение и в специализированных клетках многоклеточных животных (реснички и жгутики кле- ток ресничных эпителиев, жгутики сперматозоидов и др.). Од- нако такой принцип построения не является единственной кон- структивной формой организации тубулин-динеиновых систем. Детальный сравнительно-цитологический анализ организации жгутиков сперматозоидов разных многоклеточных животных по- казал возможность существенных изменений стандартной фор- мулы  $9+2$  даже у близкородственных животных. В жгутиках сперматозоидов некоторых групп животных двух центральных микротрубочек может не быть, а их роль играют цилиндры из электронно-плотного вещества. У низших многоклеточных (тур- беллярии и близкие к ним группы) подобного рода модифика- ции распределены у отдельных видов животных мозаично и, вероятно, полифилетичны по своему происхождению, хотя у всех этих видов образуются сходные морфологические структуры.

В настоящее время работа тубулин-динеиновой механохими- ческой системы в аксонеме представляется следующим образом: система функционирует по принципу скольжения. Химическая энергия АТФ превращается в механохимическую энергию сколь- жения одних дублетов микротрубочек относительно других в результате взаимодействия в местах временных контактов ди- неиновых «рук» с димерами тубулина в стенках микротрубочек. Таким образом, в данной механохимической системе, несмотря на существенные отличия от актин-миозиновой системы, исполь- зуется тот же принцип скольжения, базирующийся на специфи- ческом взаимодействии основных сократимых белков.

**Система промежуточных микрофиламентов.** Эта система пока изучена менее подробно, чем две уже рассмотренные, и в структурно-химическом и в общецитологическом плане (как со- ставной элемент единого цитоскелета). В специализированных клетках позвоночных животных и в межклеточных контактах,



выполняющих опорную и связующую функцию, обнаружены фибриллы диаметром около 10 нм. Их называют промежуточными, скелетными, или 10-нанометровыми филаментами. В последние годы появилось много данных о наличии таких филаментов в специализированных (эпителиальных, мышечных, нервных) клетках беспозвоночных животных. Единичные сведения имеются в отношении одноклеточных организмов. Пока нет четких описаний этой системы у высших растений.

Особенно большого развития достигает система промежуточных филаментов в клетках тканей позвоночных животных. При этом в клетках разных типов тканей у одного организма она представлена разными белками. До недавнего времени существовала довольно четкая классификация промежуточных филаментов по типам тканей, в клетках которых они встречаются. Выделялись пять основных разновидностей этих филаментов — кератины (эпителиальные ткани), виментин (мезенхимные ткани), десмин (мышечные ткани), белки нервных клеток и белок промежуточных филаментов глиальных клеток.

В настоящее время введена более сложная классификация — по типам аминокислотных последовательностей белков, входящих в состав промежуточных филаментов. Так, среди эпителиальных кератинов выделяются две группы: кислые кератины — их около 15 разновидностей молекулярной массой 40—60 кДа (они характеризуются аминокислотными последовательностями I типа), и нейтральные и основные кератины — их тоже около 15 разновидностей (50—70 кДа, аминокислотные последовательности II типа).

Следующая группа белков промежуточных филаментов с очень близкими значениями молекулярной массы характеризуется аминокислотными последовательностями III типа. Это виментин, представленный в тканях мезенхимного происхождения одним белком (53 кДа), десмин мышечных тканей (52 кДа) и глиальный фибриллярный кислый белок — ГФКБ (51 кДа).

Промежуточные филаменты нервных клеток — нейрофиламенты — образованы белками трех видов (NF-Z, NF-M, NF-H), характеризующимися IV типом аминокислотных последовательностей. В нейронах позвоночных они представлены четырьмя разновидностями (57—150 кДа), у беспозвоночных — двумя (60—200 кДа).

Белки промежуточных филаментов, по-видимому, близки по своему происхождению; степень гомологии между ними у одного организма составляет 30—50%, между белками одной группы — более 60%. При этом белки данного типа у разных организмов различаются меньше, чем разные белки в пределах одного организма. Так, десмин и виментин свиньи дают степень гомологии 64%, а десмин курицы и свиньи 91%.

Таким образом, для белков промежуточных филаментов, в отличие от актинов и тубулинов, характерна тканеспецифич-



ность, хотя в последнее время появились данные о том, что во многих типах клеток помимо основного белка промежуточных филаментов может экспрессироваться и ген, кодирующий виментин. Еще одно отличие от актина и тубулина заключается в том, что каждый белок промежуточных филаментов кодируется одним геном.

Отличия этих систем обусловлены, по-видимому, тем обстоятельством, что принцип сборки и функционирования промежуточных филаментов иной, чем у актиновых микрофибрилл и микротрубочек. Консервативность актина и тубулина вызвана прежде всего необходимостью сохранить их способность к быстрой полимеризации и деполимеризации, что накладывает жесткие ограничения на их изменения. Для промежуточных филаментов не существует таких ограничений, поскольку их разборка, как и других клеточных структур, обеспечивается деятельностью гидролитических ферментов. Очевидно, что это обстоятельство и привело к значительной дивергенции белков в ходе специализации промежуточных филаментов в конкретных клетках.

Однако, несмотря на различия в белковом составе, в молекулярной и надмолекулярной организации промежуточных филаментов существует ряд общих свойств и закономерностей, которые, по-видимому, сохранялись и однозначно совершенствовались в процессе эволюции. Так, в белках всех разновидностей промежуточных филаментов существует очень консервативный участок, который обнаруживается с помощью моноклональных антител. Иммунохимические исследования позволили выявить такой участок и в клетках высших растений, хотя сами белки пока выделить не удалось. Все промежуточные филаменты представляют собой фибриллы диаметром около 10 нм (рис. 16). Белки промежуточных филаментов в отличие от актина и тубулина не глобулярные, а фибриллярные. Молекулы этих белков построены по единому плану: в их составе различают консервативный, практически одинаковый у всех, домен и два концевых участка, сильно варьирующих и по длине, и по последовательностям аминокислот (до 700 аминокислотных остатков у высокомолекулярных белков нейрофиламентов). Центральный домен имеет палочковидную форму и состоит из 310 аминокислотных остатков. В нем различают четыре  $\alpha$ -спиральных участка, разделенных тремя линкерными районами.

В состав каждого  $\alpha$ -спирального участка входят определенные последовательности аминокислот, которые при взаимодействии с аналогичными участками соседних молекул позволяют им закручиваться одна вокруг другой, образуя суперспираль (coiled coil) (рис. 16, Б). Полимеризация таких димеров происходит путем взаимодействия концевых участков без затраты



энергии АТФ и ГТФ. При этом формируются протофибриллы, которые затем объединяются в структуру диаметром 10 нм.

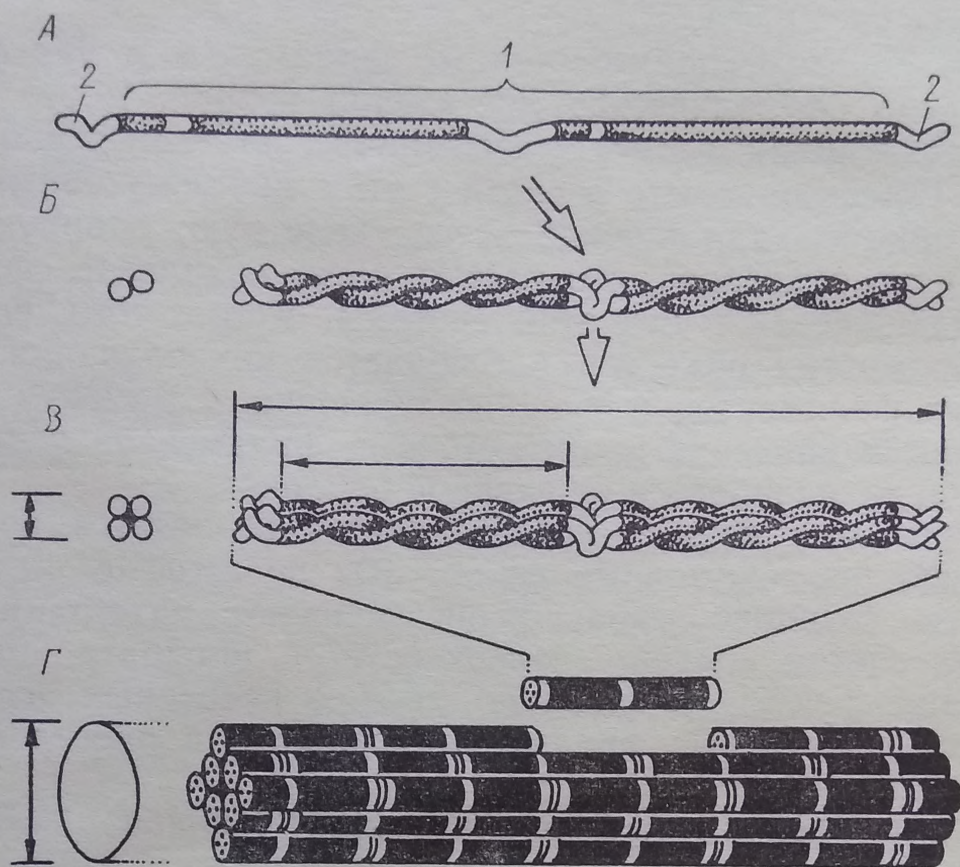


Рис. 16. Последовательные этапы сборки промежуточных филаментов.

А — мономер, Б — димер с суперспирализованными участками, В — тетрамер, Г — 10-нм фибрилла. 1 — центральный домен, 2 — концевые участки.

При образовании промежуточных филаментов в эпителиальных клетках в состав 10нм-фибриллы входят в равных количествах и основные, и кислые кератины.

Для связи промежуточных филаментов между собой существует ряд вспомогательных белков. Однако пока их известно значительно меньше, чем в актиновой и тубулиновой системах. Для кератинов — это семейство серусодержащих белков (10—30 кДа) и филаггрин (16—45 кДа). В мышечных тканях поперечные сшивки десминовых фибрилл осуществляются относительно высокомолекулярным белком синемином (300 кДа). Виментиновые филаменты также могут связываться между собой с помощью синемина и плектина — белка молекулярной массой 300 кДа. Кроме того, для сшивок промежуточных филаментов используются вспомогательные белки тубулиновой и актиновой систем (МАР 1, 2, спектрин, анкирин).

Показано, что N-концы белков промежуточных филаментов при помощи анкирина образуют тесную связь промежуточных



филаментов с мембраной, а С-концы обеспечивают прочное взаимодействие с плотной пластинкой ядерной оболочки. Белки промежуточных филаментов оказались весьма сходными по своей организации и свойствам с белками ядерного матрикса, в частности с ламинами, образующими плотную пластинку (подробнее см. ниже).

Таким образом, промежуточные филаменты в эукариотных клетках, где их количество достаточно велико, могут образовывать связующий и скелетный каркас по всей толще цитоплазмы. Естественно, что в связи с этим промежуточным филаментам приписывали прежде всего скелетную, опорную функцию. Однако оказалось, что клетки могут сохранять свою форму и подвижность и без этой системы. Кроме того, во время митоза у многих объектов наблюдается концентрация промежуточных филаментов у ядерной оболочки к моменту ее разборки. Восстановление промежуточных филаментов у дочерних клеток также начинается от ядерной оболочки.

В свете этих данных представляется вероятным предположение, что промежуточные филаменты не столько выполняют скелетную функцию, сколько обеспечивают интеграцию трех основных систем клетки — поверхностного аппарата, цитоплазмы и ядра. Такую же роль, по мнению некоторых исследователей, промежуточные филаменты играют и в процессах дифференцировки клеток.

Семейство генов, кодирующих основные белки промежуточных филаментов у позвоночных животных, характеризуется значительной эволюционной пластичностью в отличие от генов актиновой и тубулиновой систем цитоскелета. Возможно, эта особенность системы промежуточных филаментов не случайна и определяет ее сложную и важную роль в жизнедеятельности эукариотных клеток. В связи с этим в настоящее время на специализированных клетках позвоночных животных ведутся работы по выяснению молекулярно-генетических механизмов регуляции синтеза белков промежуточных филаментов.

Существенную роль в понимании общецитологического значения системы 10 нм-филаментов должны сыграть и целенаправленные сравнительно-цитологические исследования на широком круге объектов. Как уже говорилось, существуют данные о наличии этой системы у беспозвоночных животных и у некоторых одноклеточных. Так, рассмотренные выше структурные белки ресничек и жгутиков в функциональном плане аналогичны системе промежуточных филаментов животных клеток. Кроме того, в периферических микротрубочках ресничек в качестве сопутствующих элементов обнаружены микрофибриллы из особого белка тентина (47, 51, 55 кДа), гомологичного виментину и десмину. Таким образом, можно предположить, что система промежуточных филаментов столь же древняя, как и другие системы цитоскелета. Однако в связи с



особым функциональным значением этой системы в различных эукариотных клетках она представлена в разной степени.

Весьма важным признаком рассматриваемой системы является строго специфичная экспрессия генов, ответственных за синтез белков промежуточных филаментов в специализированных клетках позвоночных животных. Эта специфическая экспрессия сохраняется в злокачественных клетках и может быть использована в медицинской практике в качестве диагностического признака. Так, при возникновении метастазов иногда бывает нелегко установить из какой ткани образовалась первичная опухоль, которая впоследствии метастазировала, а это может иметь значение при выборе метода лечения. В таких случаях иммунохимическими методами с помощью антител к белкам промежуточных филаментов определяют тканевую принадлежность последних.

**Система «тонких» (fine) филаментов.** Помимо трех рассмотренных выше универсальных систем цитоскелета существенное значение для понимания общих принципов его организации имеет система так называемых «тонких» филаментов, диаметром 2—5 нм. Структурные компоненты этой системы гетерогенны по составу и функции и различаются по происхождению. Они описаны у сравнительно небольшого числа объектов и еще слабо изучены. Таким образом, объединение их в отдельную систему цитоскелета на основании сходства диаметра фибрилл в значительной мере условно. Столь же условно и выделение в этой системе трех типов филаментов: 1) сократимые филаменты, 2) связующие элементы цитоскелета — «линкеры», 3) филаменты, образующие эластичную решетку в саркомерах поперечно-полосатых мышц.

Структуры первого типа обнаружены у ряда низших эукариот. Так, у двух групп простейших (*Peritricha*, *Heterotricha*) давно описаны фибриллы диаметром 2—4 нм; у сувойки *Vorticella* они располагаются по продольной оси стебелька и обеспечивают его спиральное скручивание, оставаясь при этом прямыми. Эти фибриллы, образованные белком спазмином (20 кДа), получили название спазмоном. Для их сокращения необходимы ионы  $Ca^{2+}$  и не нужна АТФ. У брюхоресничных инфузорий имеются субпелликулярные пучки тонких филаментов диаметром 3—4 нм — мионем, которые также могут спирально скручиваться, что и приводит к сокращению тела простейшего. Белок мионем в чистом виде пока не выделен. К этому же типу филаментов можно отнести и корневые нити ресничек ряда видов водорослей и некоторых жгутиконосцев, которые при сокращении укорачиваются и сжимаются. Предполагают, что эти структуры образованы особым сократимым спазминоподобным белком молекулярной массой 20 кДа. Интересная разновидность тонких филаментов первого типа обнаружена у солнечника *Stycholonche*. В основании каждой аксо-



подии расположены пучки филаментов диаметром около 3 нм, которые и обеспечивают движение аксоподии путем попеременного скручивания и выпрямления. Биохимический состав этих филаментов пока не известен.

Еще одна разновидность тонких сократимых фибрилл обнаружена в спермиях нематод, лишенных жгутиков и перемещающихся с помощью псевдоподий. Для этих клеток характерно отсутствие всех трех цитоскелетных систем: в них не выявляются ни актиновые микрофибриллы, ни микротрубочки, ни промежуточные филаменты. Тонкие филаменты спермиев нематод состоят из белка, представленного тремя полипептидами по 15 кДа и непохожего по свойствам ни на спазмин, ни на белок корневых нитей.

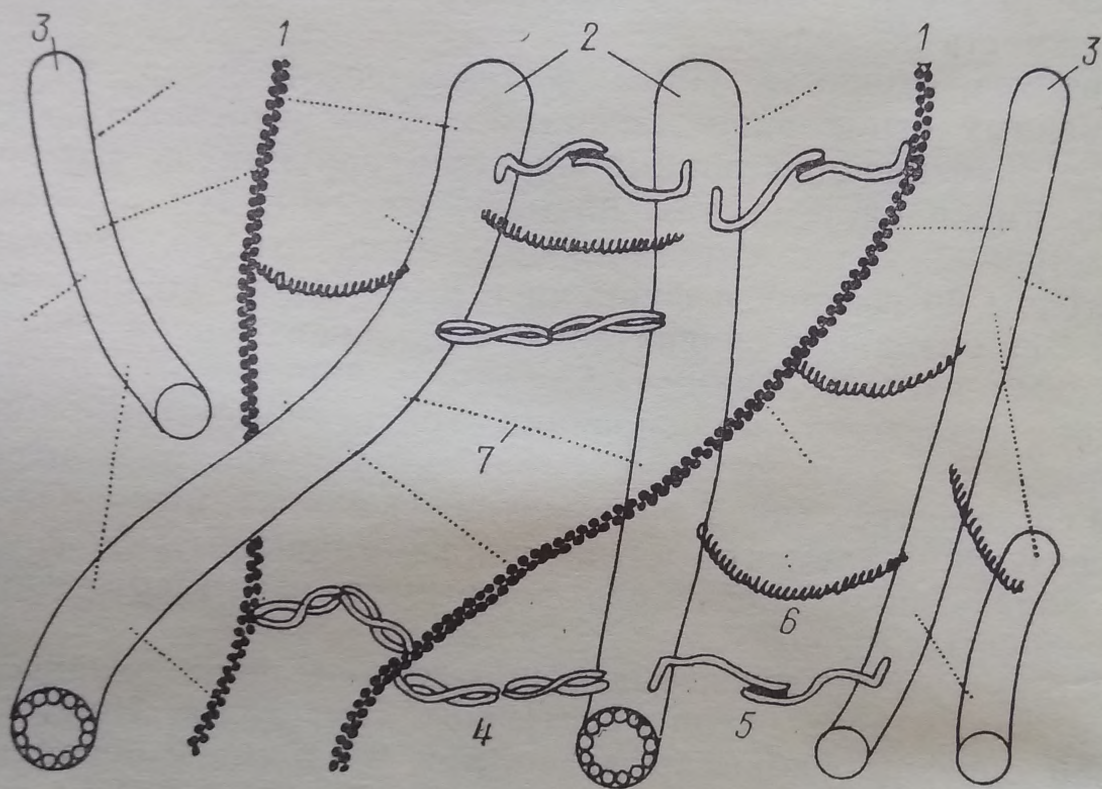


Рис. 17. Взаимосвязь основных компонентов цитоскелета.

1 — микрофиламенты, 2 — микротрубочки, 3 — промежуточные филаменты, 4 — спектрин, 5 — белки MAR-2, 6 — плектин, 7 — тонкие филаменты.

Вторую группу тонких филаментов составляют структуры, представляющие собой связующие элементы цитоскелета — «линкеры» (рис. 17). Эти филаменты были обнаружены в псевдоподиях фораминифер, где они как бы сопровождают микротрубочки по всей длине псевдоподии, образуя связки между ними. Позднее такие структуры были выявлены в митотическом аппарате некоторых водорослей. В профазе они расположены диффузно, а в прометафазе собираются вблизи кинетохорных участков хромосом. Некоторые авторы приписывают им существенную роль в аккумуляции сил натяжения, обеспечивающих движение хромосом в анафазе А (подробнее см. ниже). В культивируемых *in vitro* клетках при особых условиях



обработки детергентами, с помощью высоковольтной ультрамикроскопии удастся наблюдать густую сеть тонких фибрилл диаметром 2,5—3 нм, пронизывающую всю цитоплазму и описанную под названием микротрабекулярной решетки. Однако до сих пор не удалось выделить белки, входящие в состав этой решетки, и многие исследователи склонны считать ее артефактом.

Третью группу тонких филаментов составляют структуры, представляющие собой как бы основу саркомера поперечно-полосатых мышц. В максимально растянутых саркомерах выявляются многочисленные тонкие, параллельно расположенные фибриллы, идущие от одного Z-диска к другому. Особенно отчетливо они видны в тех участках саркомера, где заканчиваются миофибриллы. Тонкие филаменты поперечно-полосатых мышц представляют собой структуры диаметром 4—5 нм, образованные высокомолекулярным белком — коннектином, или титином (1000 кДа). Предполагают, что эти структуры не только формируют эластичную решетку в саркомере, но и создают пассивное напряжение при растягивании мышцы. Титиноподобные белки обнаружены в эритроцитах, лейкоцитах, яйцеклетках морского ежа, но соответствующих им фибрилл в этих клетках выявить пока не удалось. Немышечные титины найдены также у миксомицета *Physarum polyserphalum*, где выявляется и система филаментов диаметром 2—3 нм.

Итак, за недостатком информации, мы должны довольствоваться весьма условной классификацией тонких филаментов, тем более что многочисленные структуры подобного типа выявлены у беспозвоночных (главным образом протистов) морфологическими методами и все еще ожидают биохимического анализа. Дальнейшие сравнительно-цитологические исследования несомненно внесут ясность в эти вопросы и приблизят нас к пониманию роли данных структур в целостной системе цитоскелета.

### 2.2.3. НАДМЕМБРАННЫЕ СТРУКТУРЫ ПОВЕРХНОСТНОГО АППАРАТА

Надмембранные структуры как эукариотных, так и прокариотных клеток весьма многообразны по химическому составу, взаимоотношениям с плазматической мембраной и функциональному значению. Первичное и основное назначение надмембранных структур — это осуществление взаимодействия клеток с внешней средой или с другими клетками, т. е. реализация первых этапов рецепции в широком понимании этой функции. Однако в процессе эволюции и у прокариот, и у клеток эукариот надмембранные структуры стали играть важнейшую роль в реализации различных специфических функций: тургорной, механической, локомоторной, функции «ловушки» ионов, структурной организации ферментов и т. д.



**Надмембранные структуры прокариот.** У эубактерий эти структуры представлены клеточной стенкой, специфика организации которой служит основой для подразделения их на две таксономические группы (грациликутные и фирмикутные формы) и коррелирует с очень большим числом морфофункциональных, метаболических и генетических признаков. Клеточная стенка прокариот является, по существу, полифункциональным органоидом, выведенным за пределы протопласта и несущим значительную долю метаболической нагрузки клетки.

У фирмикутных бактерий (рис. 18, А) клеточная стенка устроена относительно просто. Непосредственно к цитоплазматической мембране прилегает жесткий муреиновый слой. Муреин, или пептидогликан, — это сополимер ацетилглюкозамина и ацетилмурамовой кислоты с поперечными олигопептидными сшивками. Не исключено, что муреиновый слой представляет собой одну гигантскую молекулу-мешок, обеспечивающую ригидность клеточной стенки и ее индивидуальную форму. В тесном контакте с муреиновым слоем находится второй полимер стенки фирмикутных бактерий — теихоевые кислоты. Им приписывается роль аккумулятора катионов и регулятора ионного обмена между клеткой и окружающей средой. Наконец, наружные слои клеточной оболочки образованы белком в комплексе с липидами. У многих видов бактерий обнаружен ригидный слой поверхностных белковых глобул (S-слой), форма, размер и характер расположения которых специфичны для вида. Внутри клеточной стенки, а также непосредственно на ее поверхности помещаются ферменты, расщепляющие субстраты до низкомолекулярных компонентов, которые транспортируются через цитоплазматическую мембрану внутрь клетки. Здесь же находятся ферменты, синтезирующие внеклеточные полимеры, например капсульные полисахариды. Полисахаридная капсула, снаружи обволакивающая клеточную стенку ряда бактерий, не обязательна для жизнедеятельности клетки. Она имеет в основном частноприспособительное значение, например обеспечивает прикрепление клеток к плотным субстратам, аккумулирует некоторые минеральные вещества и у патогенных форм препятствует их фагоцитированию.

Клеточная стенка фирмикутных бактерий играет роль молекулярного сита, избирательно осуществляя пассивный транспорт ионов, субстратов и метаболитов. Наконец, отдельные участки клеточной стенки тесно ассоциированы с цитоплазматической мембраной в зоне прикрепления нуклеоида и играют важную роль в его репликации и сегрегации.

По сравнению с фирмикутными формами клеточная стенка грациликутных эубактерий более сложно устроена и ее физиологическое значение несравненно шире. Над муреиновым слоем располагается вторая белково-липидная мембрана (рис. 18, Б), в состав которой входят липополисахариды. Она ковалентно



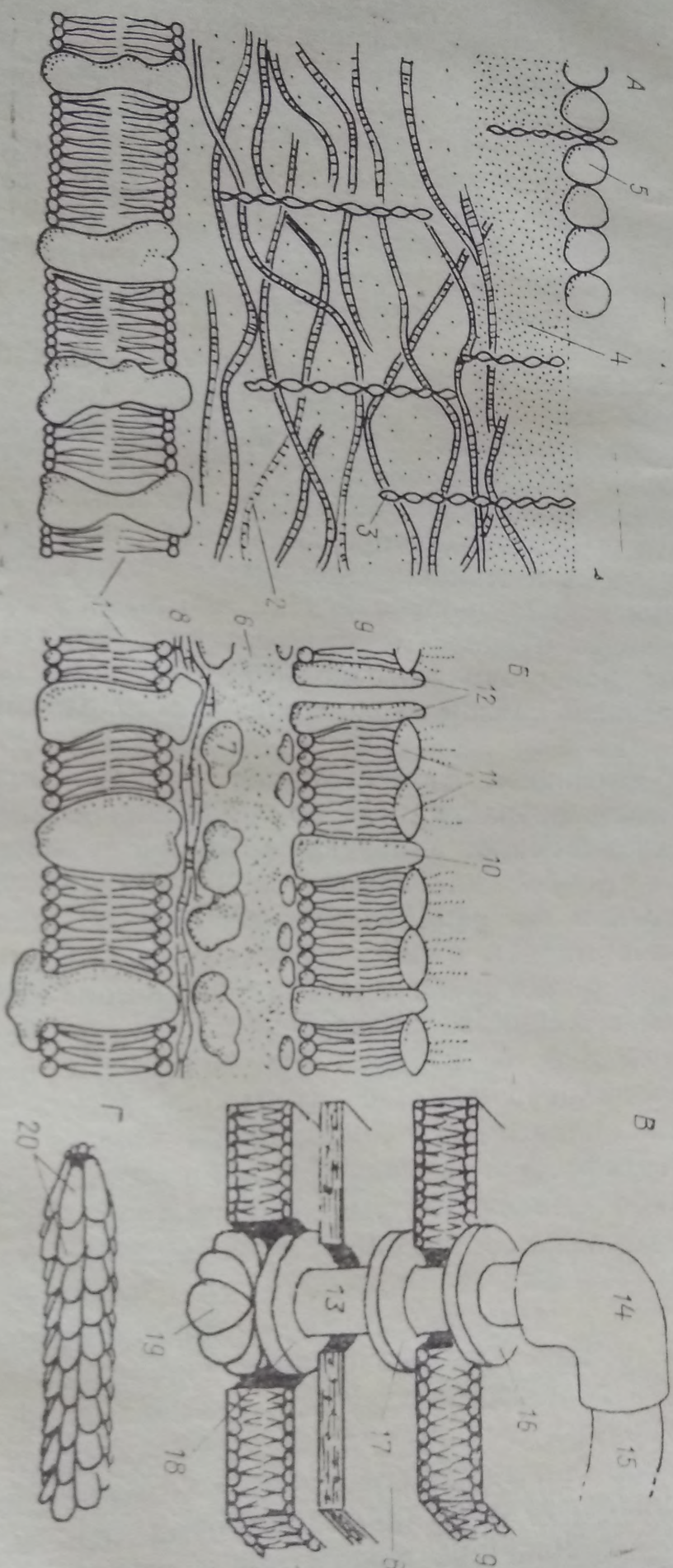


Рис. 18. Строение клеточной стенки фирмикутных (А) и грациликутных (Б-Г) бактерий.

1 — плазматическая мембрана; 2 — пептидогликаны; 3 — тейхоевые кислоты; 4 — белки наружной поверхности; 5 — ригидный S-слой; 6 — периплазматическое пространство; 7 — белки периплазматического пространства; 8 — муреиновый слой; 9 — наружная мембрана; 10 — липопротейны; 11 — липополисахариды; 12 — порины; 13 — ось, 14 — крюк и 15 — нить жгутика; 16 — 18 — нить жгутика; 19 — диск M; 20 — нить жгутика, образованная молекулами флагеллина.



связана с муреином сшивками из молекул липопотеина. Эта мембрана отличается от обычной и наличием уникальных белков — поринов, участвующих в пассивном транспорте низкомолекулярных веществ, что позволяет наружной мембране грациликутных бактерий (так же как клеточной стенке фирмикутных) играть роль молекулярного сита. Липополисахариды наружной мембраны обеспечивают иммуноспецифичность клетки и отвечают за первые этапы взаимодействия клеток друг с другом и паразитами прокариот — бактериофагами.

Пространство, ограниченное наружной и цитоплазматической мембранами, носит название периплазматического и является уникальной принадлежностью грациликутных бактерий. В нем локализуется целый набор ферментов — фосфатаз, гидролаз, нуклеаз и т. д. Они расщепляют сравнительно высокомолекулярные питательные субстраты, а также разрушают собственный клеточный материал, выделяемый в окружающую среду из цитоплазмы. В известной степени периплазматическое пространство можно уподобить лизосоме эукариот. В зоне периплазмы оказывается возможным не только максимально эффективное протекание энзиматических реакций, но и изоляция от цитоплазмы соединений, представляющих угрозу для ее нормального функционирования. У бактерий, обладающих способностью к активному движению за счет жгутиков, клеточная стенка является компонентом локомоторного механизма (рис. 18, В, Г).

Надмембранные структуры прокариот могут значительно варьировать по составу. Так, компонентом клеточной стенки некоторых археобактерий является псевдомуреин (в отличие от муреина большинства видов), у других археобактерий в клеточной стенке обнаруживаются гетерополисахариды и т. д. Однако все эти разнообразные соединения образуют сходную в морфофункциональном отношении структуру, чрезвычайно важную для жизнедеятельности клеток. Надмембранные структуры характерны для огромного большинства прокариотных организмов; отсутствие же этих структур (как у микоплазмы, некоторых термоацидофильных археобактерий и т. д.) является результатом вторичной редукции.

**Надмембранные структуры эукариотных клеток.** Все многообразие надмембранных структур эукариотных клеток можно разделить на две основные категории: собственно надмембранный комплекс (или гликокаликс) и производные надмембранного комплекса (или сложные надмембранные структуры).

Гликокаликс, или собственно надмембранный комплекс, по структурно-функциональным особенностям можно подразделить на несколько разновидностей. К первой относится гликокаликс, в состав которого входят периферические белки мембраны, углеводные компоненты мембранных гликолипидов и гликопротеинов, а также рабочие части интегральных белков,



заякоренных в мембране одним  $\alpha$ -спиральным гидрофобным участком (рис. 19, А).

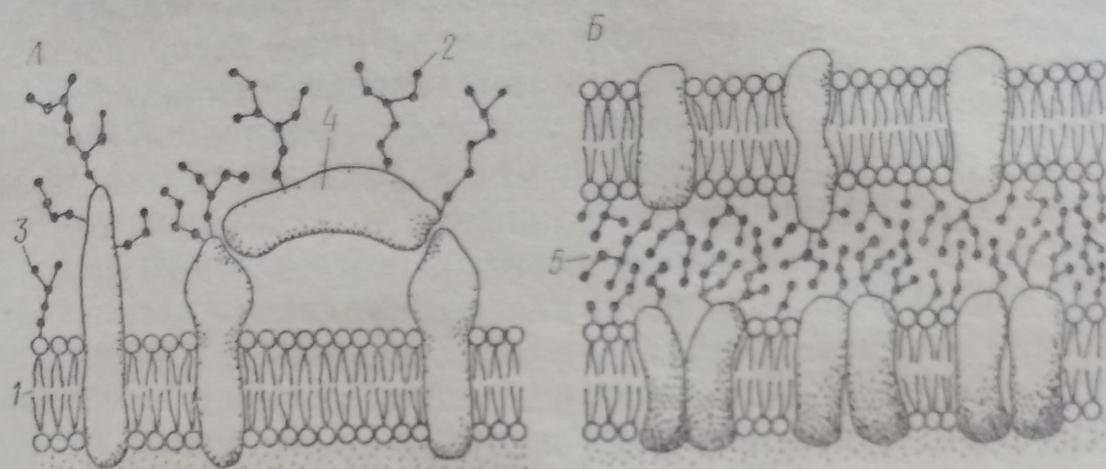


Рис. 19. Организация надмембранного комплекса.

А — эукариотная клетка, Б — область холинэргического синапса. 1 — плазматическая мембрана; 2, 3 — углеводные компоненты гликопротеинов (2) и гликолипидов (3); 4 — адсорбированный гликопротеин; 5 — ганглиозиды в синаптической щели.

Гликокаликс максимально развит в клетках мета- и простейших организмов, имеется он и у клеток растений. Находясь в непосредственном контакте с внешней средой, он играет важную роль в рецепторной функции поверхностного аппарата клеток.

Углеводный компонент гликокаликса помимо участия в рецепции может выполнять разнообразные специальные функции. Так, в поверхностном аппарате эритроцитов млекопитающих мощно развитый углеводный компонент интегрального гликопротеина — гликофорина — необходим для создания отрицательного заряда на поверхности эритроцитов, что препятствует их агглютинации.

В пре- и постсинаптической мембранах нервных клеток имеются в больших количествах специфические гликолипиды — ганглиозиды, углеводные компоненты которых, составляя основную часть гликокаликса, занимают почти всю синаптическую щель (рис. 19, Б). Предполагается, что эти углеводные компоненты участвуют в процессах, обуславливающих явление долговременной памяти. Наконец, мощно развитый гликокаликс слезных клеток и клеток реабсорбционных отделов эпителиальных осморегулирующих и выделительных канальцев играет прежде всего роль ионных «ловушек», создавая повышенную концентрацию ионов в определенных участках поверхностного аппарата, что необходимо для реализации этими клетками их специфической реабсорбционной функции.

Кроме такого рода специализированных функций углеводный компонент гликокаликса метазойных клеток играет важную роль в их индивидуализации. Молекулы углеводов, находящиеся на поверхности клеток, являются как бы маркерами,



придающими клетке «свое лицо». Это оказывается возможным благодаря чрезвычайному разнообразию химических связей в молекулах углеводов, что приводит к возникновению многочисленных вариантов углеводного «рисунка» поверхности. Для каждой клетки этот рисунок весьма специфичен и не является полностью идентичным даже у клеток однородной по происхождению популяции. На этом основано, в частности, «узнавание» клетками друг друга в опытах с размельчением губок разных видов до отдельных клеток и последующей реассоциации их: воссоединялись лишь клетки, принадлежащие к данному виду. Подобные результаты наблюдались и в аналогичных опытах по диссоциации разных эмбриональных зачатков.

Белковые компоненты гликокаликса также могут выполнять различные функции. Большинство белков, рабочая часть которых входит в состав гликокаликса, играют важную роль в рецепции.

Примером таких белков служат специфические рецепторы В-лимфоцитов — иммуноглобулины, молекулы которых закреплены в мембране одним гидрофобным участком, а рабочая, переменная часть молекулы, несущая антигенные детерминанты, находится в надмембранной области. В составе гликокаликса в основном сосредоточиваются и рабочие части других рецепторов надсемейства иммуноглобулинов, рецепторов к гормонам, к белкам клеточной адгезии и др. (см. ниже).

Белковые компоненты гликокаликса могут выполнять и другие функции. Например, в мембране микроворсинок кишечного эпителия закорены белки, представляющие собой ферментативные комплексы, участвующие в процессах пищеварения. Их функциональная часть также входит в состав гликокаликса. Они прочно связаны с мембраной. Для того, чтобы разрушить эти связи, необходима обработка столь сильно действующим агентом, как трипсин.

Надмембранные структуры поверхностного аппарата, вступая в контакты с соседними клетками и межклеточными структурами, могут выполнять также функции стабилизации интегральных белков в жидкостной липидной фазе плазматической мембраны.

Характерной особенностью гликокаликса многих исследованных клеток является высокая скорость обновления. Этим обуславливаются большая функциональная и филогенетическая пластичность системы поверхностных структур, а также возможность генетического контроля за ними при изменении внешней для клетки среды.

К следующей разновидности гликокаликса относятся структуры, в состав которых помимо перечисленных выше компонентов входят какие-либо адсорбированные соединения, не производящиеся самой клеткой. Такие структуры не очень широко распространены и характерны, по-видимому, преимущест-



венно для специализированных клеток многоклеточных животных. Это тип гликокаликса наиболее хорошо изучен в кишечном эпителии млекопитающих и в нефронах почек позвоночных.

В гликокаликсе микроворсинок клеток кишечного эпителия адсорбируются гидролитические ферменты из полости кишки (рис. 20, А, Б). Их переход из взвешенного состояния в фиксированное создает базу для качественно иного типа пищеварения, так называемого пристеночного. Оно занимает промежуточное положение между полостным и внутриклеточным и играет важную роль в расщеплении перерабатываемых в полости пищеварительного тракта соединений и подготовке их для трансмембранного транспорта в виде аминокислот, дипептидов, жирных кислот и других простых соединений.

Иную функцию несут белки надмембранных структур, адсорбируемые из крови на гликокаликсе отростков подоцитов — специализированных эпителиальных клеток, одного из основных компонентов фильтрационного аппарата мочевых канальцев почек (рис. 20, В, Г). Здесь этот белковый слой играет роль последнего фильтра на пути первичной мочи из плазмы крови в полости капсулы нефрона.

Еще одной разновидностью гликокаликса, или собственно надмембранного комплекса являются системы, в состав которых входят структуры, производящиеся самой клеткой, но не сохранившие структурной связи с мембраной. Примером таких структур может служить адгезивный белок фибронектин. Роль фибронектина и подобных ему белков в жизнедеятельности клеток будет описана ниже.

Особая категория надмембранного аппарата эукариотных клеток — это производные надмембранного комплекса, или сложные надмембранные структуры (рис. 21). К ним относятся клеточные стенки растений и внеклеточные образования клеток метазойных организмов (например, кутикулы).

Надмембранные структуры такого типа сильно варьируют по строению и функциональному значению. Их химический состав отличается большим разнообразием, чем состав других систем поверхностного аппарата. Так, полисахариды — один из основных компонентов сложных надмембранных структур — могут быть представлены целлюлозой, хитином, разного рода сульфатированными мукополисахаридами и др. Однако для формирования таких надмембранных структур у весьма отдаленных по происхождению клеток в процессе эволюции используются сходные соединения. Примером цитологического параллелизма такого рода является, например, способность клеток кутикулярного эпителия асцидий формировать туницин — разновидность целлюлозы, полисахарида, специфического для стенок растительных клеток.

Второй, не менее яркий пример подобного явления — по-



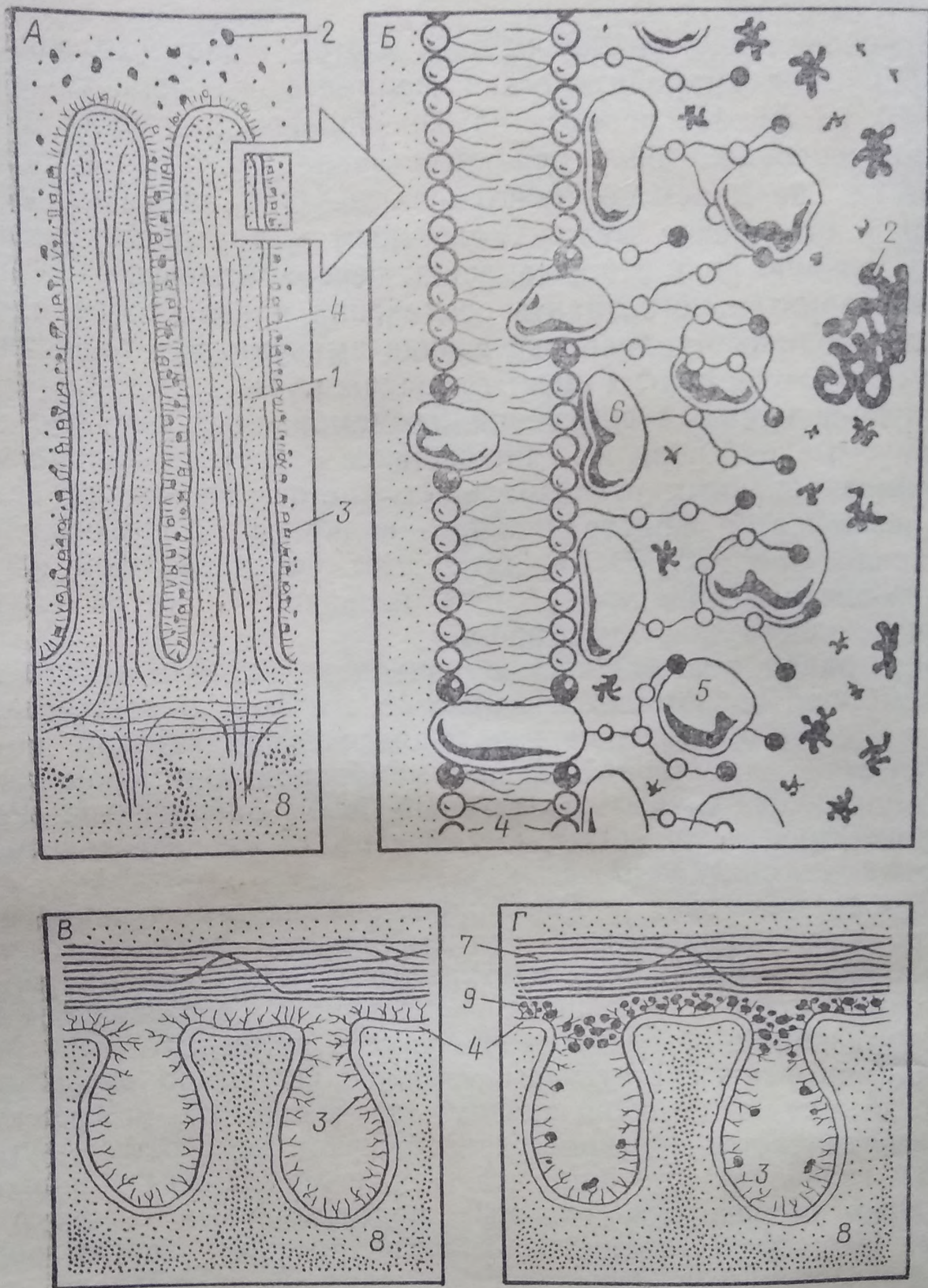


Рис. 20. Надмембранный комплекс микроворсинок кишечного эпителия (А, Б) и отростков подоцитов почки млекопитающих (В, Г), зафиксированных без сохранения (В) и с сохранением (Г) адсорбированных белков.

1 — микроворсинки, 2 — частицы пищи в полости кишки, 3 — углеводные компоненты гликолипидов и гликопротеинов мембраны, 4 — плазматическая мембрана, 5 — ферменты пристеночного пищеварения, 6 — периферические белки, 7 — базальная мембрана, 8 — цитоплазма клеток, 9 — адсорбированные белки.



строение клеточной стенки грибов из хитина, полисахарида, характерного для кутикулярных структур многих беспозвоночных животных. Интересно, что в состав полимерных молекул хитина и бактериального муреина входит один и тот же мономер — этерифицированный глюкозамин. Количество таких примеров непрерывно растет по мере детализации химического строения рассматриваемых структур клеток различных организмов.

Несмотря на большое разнообразие химического состава сложных надмембранных структур в их морфофункциональной организации и во взаимоотношениях с клеткой отчетливо прослеживаются общие закономерности.

Один из общих принципов структурно-химической организации этих образований — наличие сложного каркаса из параллельно расположенных фибрилл и волокон, связанных поперечными перемычками (рис. 21, В); промежутки между компонентами каркаса заполняет аморфный матрикс. Роль каркаса чаще всего выполняют полисахариды типа хитина и целлюлозы. В состав матрикса у животных входят белки, а у растений — пектины, гемицеллюлозы и инкрустирующие вещества. Достаточно широко распространены и обратные отношения, когда каркас построен из специальных склеропротеинов, а в роли заполнителя выступают кислые мукополисахариды и гликопротеины. Именно такой принцип лежит в основе построения кутикулярного эпителия полихет и механических скелетных тканей позвоночных животных (рис. 21, Г).

Другой особенностью надмембранных структур рассматриваемого типа является то, что их формирование и деятельность находятся под постоянным контролем со стороны клеток. Такой контроль у различных эукариотных клеток осуществляется по-разному, однако биологический смысл его во всех случаях, вероятно, один и тот же — обеспечить максимальную приспособленность внеклеточных структур к конкретным условиям жизнедеятельности данных клеток. Так, клеточная стенка высших растений образуется с помощью нескольких механизмов. Фибриллы целлюлозы собираются на поверхности клетки при помощи специальных ферментов, встроенных в плазматическую мембрану, которые и осуществляют полимеризацию данного полисахарида из моносахаридов. При этом ориентация фибрилл зависит от расположения микротрубочек в периферических слоях цитоплазмы: фибриллы целлюлозы лежат параллельно микротрубочкам (рис. 21, А, Б). Аналогичный молекулярный механизм действует, по-видимому, и в клетках кутикулярных эпителиев артроподного типа при синтезе хитина, протеиновой или тунициновой основы кутикул. Полисахаридные компоненты клеточной стенки растений синтезируются в аппарате Гольджи, транспортируются в секреторных пузырьках к поверхности клетки и выделяются путем экзоцитоза



(рис. 21, А). Наконец, в некоторых случаях целые участки цитоплазмы клеток как бы перерождаются и полностью включаются в состав клеточной стенки. Это явление в какой-то степени можно уподобить апокриновой секреции.

Лабильность механизмов образования клеточной стенки особенно четко выявляется при действии некоторых гормонов. Например, гормон кинетин ингибирует растяжение клеток; под его влиянием меняется ориентация микротрубочек цитоплазмы и соответственно фибрилл целлюлозы клеточной стенки, что и изменяет ее механические свойства. Обратное действие оказывает гиббереллин, стимулирующий растяжение клеток. Под его влиянием также меняется ориентация микротрубочек и вслед за ними целлюлозных фибрилл клеточной стенки, что облегчает растягивание клетки в нужном направлении. Наконец, наиболее существенные изменения клеточная стенка высших растений претерпевает под влиянием ауксинов. В результате их действия происходит активация протонных помп, вмонтированных в плазматическую мембрану растительных клеток. Это приводит к повышению концентрации водородных ионов в области клеточной стенки, что, в свою очередь, вызывает активацию гидролитических ферментов, содержащихся в клеточной стенке в латентной форме. Под действием ауксинов разрушаются компоненты клеточной стенки, она значительно «разрыхляется», что обеспечивает клеткам растений возможность роста в длину.

Аналогичные механизмы клеточного контроля за деятельностью надмембранных структур обнаружены у прокариотных клеток. Так, у одного из видов бактерий процесс разрушения старой клеточной стенки при делении обеспечивается работой по крайней мере четырех систем гидролитических ферментов, находящихся в клеточной стенке в латентном состоянии. При делении клеток происходит закономерная и строго последовательная активация этих систем, что и приводит к постепенному разрушению и слущиванию старой («материнской») оболочки бактериальной клетки.

Сложные системы клеточного контроля над внеклеточными структурами имеются и у клеток кутикулярных эпителиев и интерстициальных тканей некоторых многоклеточных животных. Эти вопросы подробно рассматриваются в курсе гистологии.

Внеклеточные структуры, в свою очередь, могут оказывать влияние на жизнедеятельность клеток. Воздействия производных надмембранных структур на рецепторную систему поверхностного аппарата существенно влияют и на поведение клеток, и на процессы их дифференцировки. Такие данные удалось получить на культивируемых *in vitro* механоцитах позвоночных и в опытах с клетками эмбриональных зачатков (подробнее см. ниже).



Таким образом, реальные отношения между клетками и окружаемыми ими внеклеточными структурами могут носить характер не одностороннего клеточного контроля, а настоящего тесного взаимодействия.

## 2.3. ЕДИНСТВО СИСТЕМ ПОВЕРХНОСТНОГО АППАРАТА В РЕАЛИЗАЦИИ ОСНОВНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ФУНКЦИЙ

### 2.3.1. РЕЦЕПТОРНАЯ ФУНКЦИЯ

Рецепторная функция — одна из главных, универсальных для всех клеток функций поверхностного аппарата. Она определяет взаимоотношения клеток с внешней средой и соседними клетками и лежит в основе таких явлений, как различные таксисы свободноживущих клеток, оплодотворение, морфогенез, дифференцировка и т. д.

Все проявления рецепторной функции определяются наличием в поверхностном аппарате клеток разнообразных рецепторов, которые запускают целый ряд сложных процессов, обуславливающих те или иные изменения поведения клеток или внутриклеточного метаболизма. Существование рецепторов (и в первую очередь хеморецепторов) в плазматической мембране клеток постулировалось уже в начале XX в. на основании простых цитофизиологических и протозоологических исследований (рис. 22). Нарушение нормальной рецепции, утрата или видоизменение рецепторов клеточной поверхности являются одним из признаков малигнизации — злокачественного перерождения клеток многоклеточных организмов.

При исследовании рецепции в настоящее время стремятся использовать достаточно широкий круг объектов, включая не только одноклеточных эукариот, но и прокариот, что позволяет приблизиться к выяснению общих закономерностей организации рецепции и их модификаций у клеток разного уровня дифференциации.

**Рецепция у прокариот.** Одним из аспектов исследования рецепции у прокариот является анализ молекулярного механизма регуляции хемотаксиса (рис. 23).

Перемещение бактерий в пространстве происходит при помощи жгутиков, базальное тело которых вмонтировано в клеточную оболочку. Нить жгутика — флагелла — представляет собой спиральную трубочку из белка флагеллина (рис. 18, Г). Вращение основания каждого жгутика против часовой стрелки позволяет им собираться в пучок и обеспечивает прямолинейное перемещение бактерий в одном направлении (рис. 23, А). Вращение по часовой стрелке, наоборот, вызывает разобщение работы жгутиков, и бактерия начинает кувыркаться на месте (рис. 23, В). Благодаря этому механизму бактерии могут регу-



лизовать процессы хемотаксиса — направленного перемещения относительно источника раздражения. В случае положительного таксиса увеличивается время прямолинейного движения бактерий и уменьшается количество и продолжительность кувырканний на месте. Анализ механизмов регуляции хемотаксиса показал, что ее осуществляет система рецепторов и белков-переносчиков, находящихся в периплазматическом пространстве и в плазматической мембране (рис. 23, Г). Первую группу рецепторов составляют растворимые белки периплазматического пространства. Они же используются и в транспорте веществ через плазматическую мембрану. Задействованные рецепторы периплазматического пространства взаимодействуют с одним из трех белков, вмонтированных в плазматическую мембрану и получивших название метилакцептирующих белков хемотаксиса (МБХ) I, II и III классов. Активация этих белков приводит к выделению веществ, вызывающих вращение основания каждого жгутика против часовой стрелки и, следовательно, прямолинейное перемещение бактерии к стимулирующему агенту (рис. 23, Б). Однако через некоторое время происходит метилирование

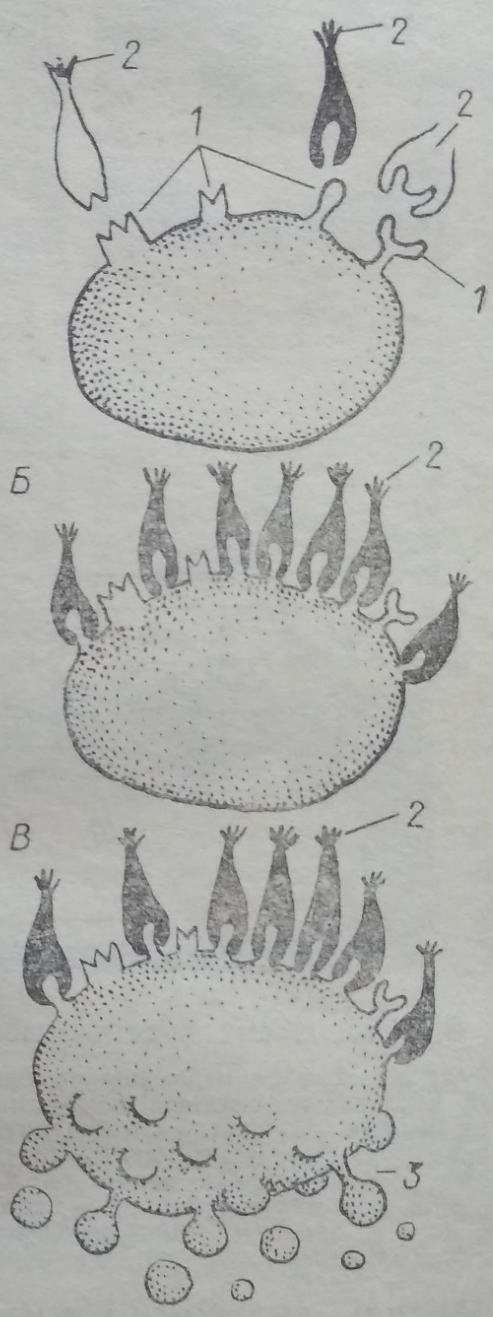


Рис. 22. Схема работы рецепторов клеточной поверхности по П. Эрлиху.  
 А — клетка с неактивными рецепторами (1), Б — активация одного из рецепторов специфическим для него агентом (2), В — специфический ответ клетки — выделение секрета (3).

МБХ, резко снижающее мощность сигнала. Для поддержания направленного перемещения необходимо снова стимулировать МБХ активными рецепторами периплазматического пространства.

В функционировании этой системы отчетливо проявляется единство всех частей поверхностного аппарата прокариот. Механизм регуляции работы белковых рецепторов при помощи метилирования, по-видимому, достаточно универсален, поскольку сходные процессы имеют место в хемотаксисе водорослей, а



также при регуляции хемотаксиса у нейтрофилов (при перемещении к очагу воспаления).

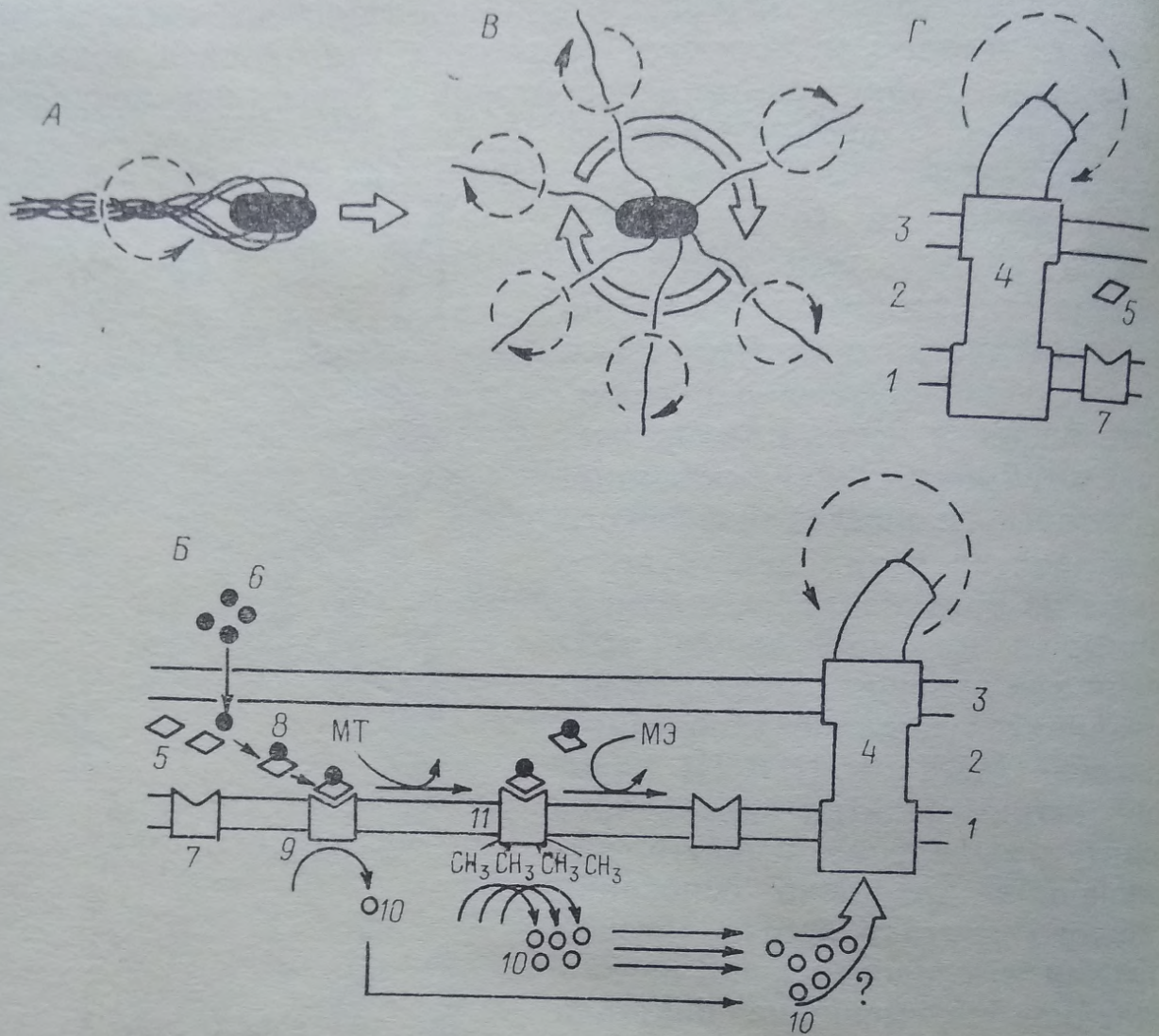


Рис. 23. Схема предполагаемого механизма хемотаксиса бактерий.

А, Б — направленное перемещение бактерий; В, Г — вращение бактерий на месте. Толстыми стрелками показано направление движения бактерии, пунктирными — направление вращения жгутика. 1 — плазматическая мембрана, 2 — периплазматическое пространство, 3 — наружная мембрана, 4 — жгутик, 5 — рецептор, 6 — лиганд, 7 — белок-эффектор, 8 — комплекс рецептора с лигандом, 9 — комплекс задействованного рецептора с белком-эффектором, 10 — медиатор, 11 — метилированный белок-эффектор. МТ — метилтрансфераза, МЭ — метилэстераза.

**Модель культивируемых *in vitro* фибробластов.** Одним из модельных объектов для изучения рецепции у эукариот являются клетки первичных культур фибробластов. Подробно изучено поведение этих клеток при прикреплении их к субстрату и детально проанализированы изменения в субмембранной системе их поверхностного аппарата. Клетки прикрепляются к субстрату не сразу, а лишь претерпев ряд характерных изменений, определяемых специфической рецепцией (рис. 24). При переходе от взвешенного состояния к распластанному клетки сперва образуют длинные тонкие выросты с булавовидными утолщениями на концах (филлоподии), которыми как бы ощупывают субстрат (рис. 24, А, Г), а затем формируют мощные отростки



(ламеллоподии), обеспечивающие закрепление на субстрате (рис. 24, Б, Д). Лишь после этого клетка уплощается и прикрепляется к субстрату, причем не всей поверхностью, а участками, расположенными через определенные промежутки (рис.

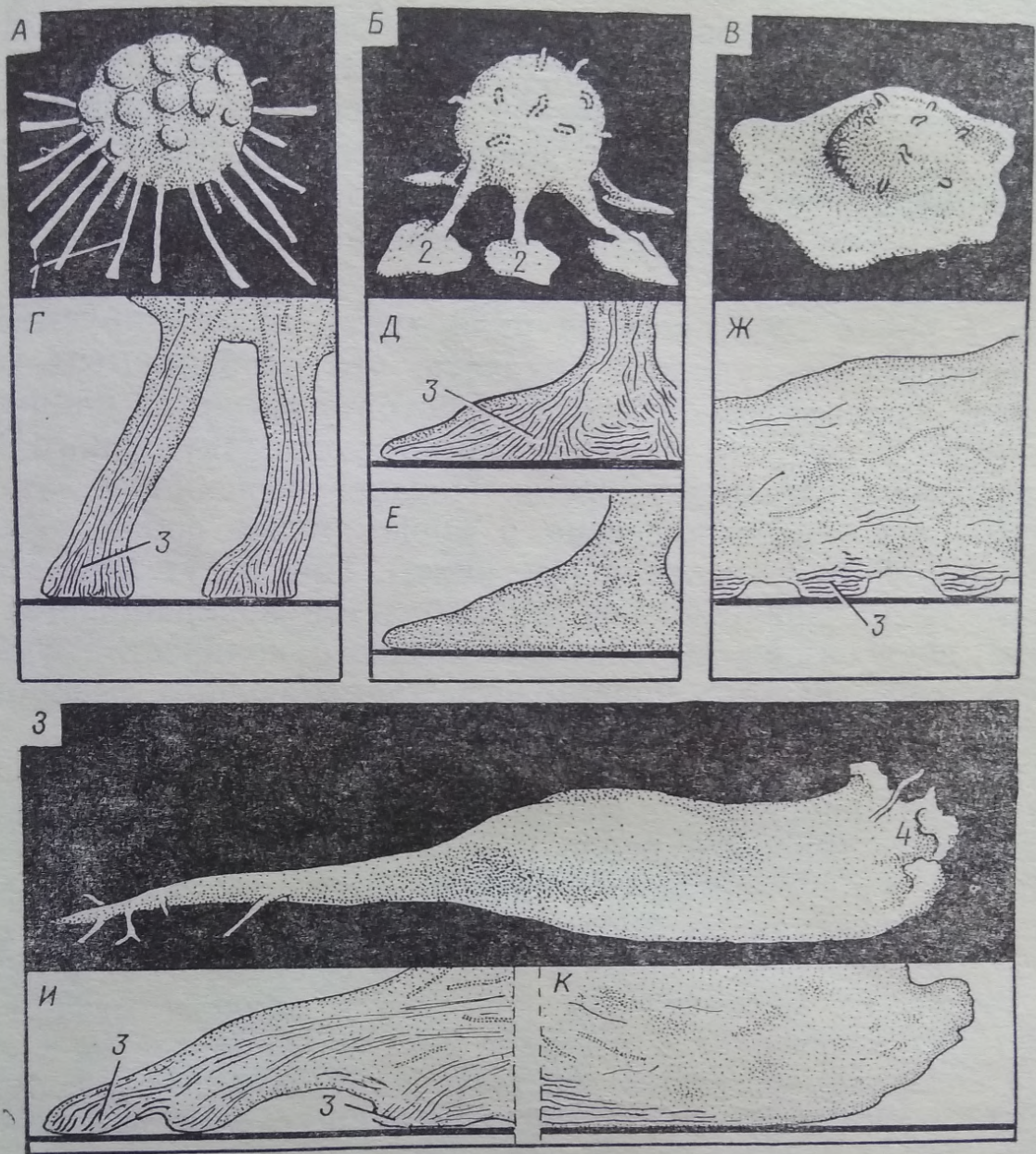


Рис. 24. Изменение морфологии культивируемых *in vitro* клеток в процессе их прикрепления (А—Ж) и перемещения (З—К) по субстрату.

А—В—общий вид клетки на стадиях образования филлоподий (А), ламеллоподий (Б) и полного распластывания (В); Г, Д—микрофибриллярный аппарат в филлоподиях (Г) и ламеллоподиях (Д) прикрепляющихся клеток; Е—ламеллоподия трансформированной клетки (микрофибриллярные структуры отсутствуют); Ж—участок полностью распластанной клетки; З—К—поляризованная клетка (З), ее прикрепленный участок (И) и участок в области ведущего края (К). 1—филлоподии, 2—ламеллоподии, 3—микрофибриллярный аппарат, 4—ведущий край (ундулирующая мембрана).

24, В, Ж). Формирование субмембранного фибриллярного опорносократимого аппарата происходит только в этих участках (подробнее см. ниже). Последующее перемещение по субстрату осуществляется путем перетекания цитоплазмы и образования ундулирующей мембраны на одном из полюсов клетки (рис. 24, З—К).

В этих процессах участвуют микрофибриллярная и микро-



трубчатая субмембранные системы, претерпевающие непрерывные и закономерные структурные изменения. На первом этапе прикрепления в тесном контакте с плазматической мембраной формируются актиновые микрофибриллы, после чего на некотором удалении от мембраны возникает система микротрубочек. Опыты с использованием ингибиторов микрофибриллярной и тубулиновой систем показали, что первая система ответственна за основные механохимические процессы, обуславливающие сложные изменения клеточной поверхности и цитоплазмы. Микротрубчатая тубулиновая система в данном случае играет организующую роль, придавая клеточным перемещениям направленный характер.

Еще в конце 70-х годов на ряде линий культивируемых *in vitro* фибробластов удалось показать, что необходимым условием прикрепления этих клеток к субстрату является наличие в среде (или, вернее, на дне сосуда) высокомолекулярного белка — глобулина сыворотки крови. Позднее выяснилось, что он синтезируется клетками печени и представляет собой сывороточную форму фибронектина (см. ниже). При отсутствии в среде этого белка прикрепление фибробластов задерживается до тех пор, пока они не выделяют достаточного количества фибронектина «собственного» производства, заменяющего сывороточный фибронектин.

Ультраструктурный анализ клеточной поверхности показал, что в местах прикрепления фибробластов к субстрату фибриллы фибронектина непосредственно контактируют с плазматической мембраной, а в субмембранной цитоплазме в этих участках формируются структуры из фибриллярного актина. При этом создавалось впечатление о прямом переходе фибронектина в актин или, точнее, их механическом контакте в области мембраны. Дальнейшее исследование участков прикрепления клеток к субстрату показало, что взаимодействие надмембранных и субмембранных структур значительно сложнее. Оказалось, что фибронектин — один из основных белков клеточной адгезии — у позвоночных существует в двух формах. Одна из них (220—240 кДа), содержащая около 5% углеводов, обнаруживается на поверхности фибробластов (и ряда других культивируемых *in vitro* клеток) и представлена по крайней мере двенадцатью вариантами. Другая форма фибронектина (200—220 кДа) выделяется клетками печени и свободно циркулирует в плазме крови.

Фибронектин в больших количествах содержится в эмбриональных тканях. Он обеспечивает не только прикрепление клеток к субстрату, но и их направленную миграцию в онтогенезе; участвует он и в процессах свертывания крови. Наличие фибронектина на клеточной поверхности является необходимым условием специфической дифференцировки многих клеток. Без него фибробласты не синтезируют или не выделяют коллаген, гладкие мышцы утрачивают контрактильный аппарат, а отростки



нервных клеток теряют способность к закономерному направленному росту.

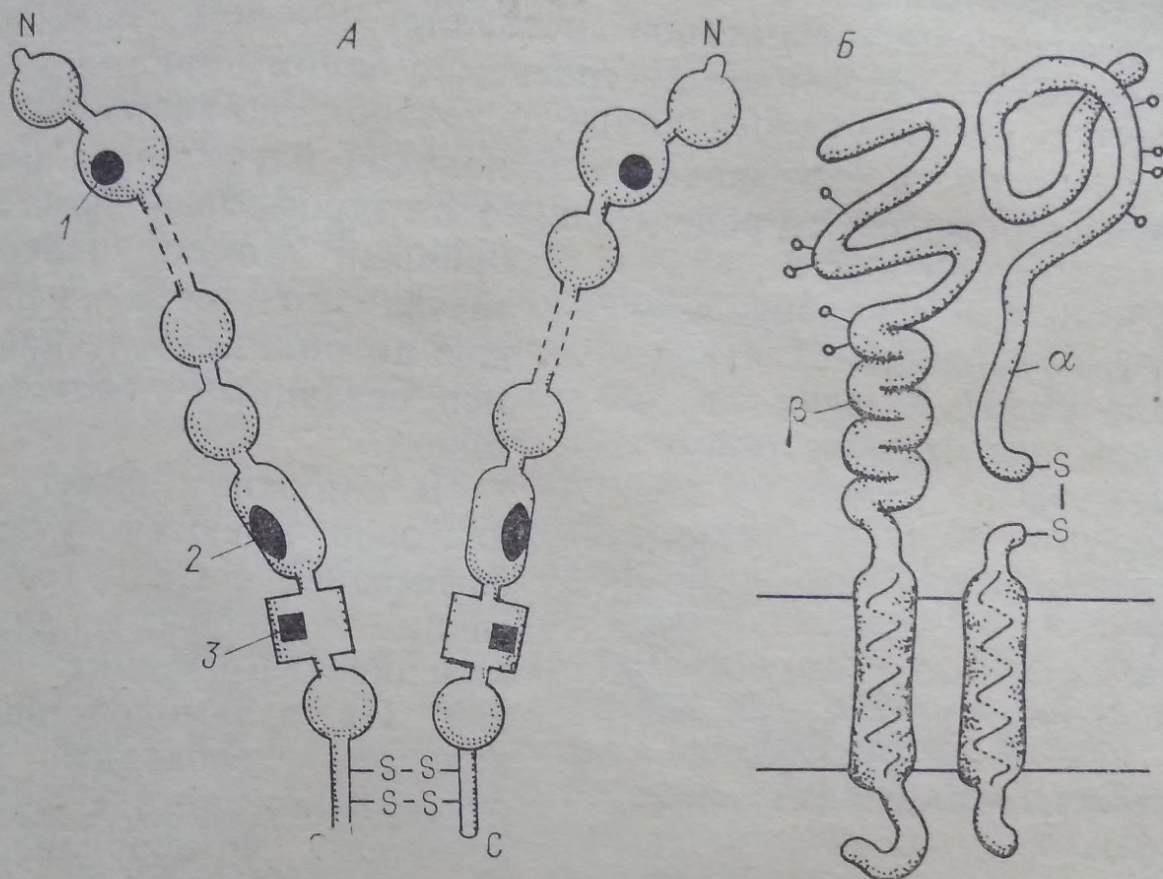


Рис. 25. Строение молекул фибронектина (А) и интегринового рецептора (Б).  
1—3 — центры связывания фибронектина с различными веществами.

Организация и свойства молекул фибронектина изучены достаточно подробно. Обе формы фибронектина кодируются одним геном с использованием механизма альтернативного сплайсинга. Функционирующая молекула представлена димером, состоящим из двух одинаковых мономеров, связанных в области С-концов S—S-связями (рис. 25, А). Мономеры построены из повторяющихся последовательностей трех типов, содержащих 45 (I), 60 (II) и 90 (III) аминокислотных остатков, при этом повторы I и II встречаются и в других белках, а III специфичен для фибронектинов. Каждый из мономеров имеет участки связывания с гепарином, фибрином, коллагеном и клеточной поверхностью. В повторяющихся участках гомология между фибронектинами разных видов млекопитающих достигает 90%. Сайт узнавания клеточной поверхности состоит из четырех аминокислотных остатков: Arg, Gly, Asp, Ser. Он характерен и для других адгезивных белков (например, коллагена). Любая замена в этом сайте, например аспарагина на глютамин (добавка одной метильной группы), препятствует связыванию белка с клеточной поверхностью. Взаимодействие с клеточной поверхностью происходит с помощью специальных рецепторов, которые имеются у всех клеток позвоночных. Они получили название



интегринов и состоят из двух цепей —  $\alpha$ - и  $\beta$ - (рис. 25, Б). Между ними гомологии нет; процент гомологии между аналогичными цепями в каждой из четырех существующих разновидностей интегриновых рецепторов составляет 40—50%. Все рецепторы семейства интегринов построены по одному принципу. Они имеют большой наружный домен, в котором, по-видимому, обе цепи участвуют в связывании с молекулой адгезивного белка. Вторая часть молекулы рецептора — это гидрофобный трансмембранный домен. Наконец, третья его часть — небольшой цитоплазматический домен, связанный с белком талином.

В наружном домене рецепторов имеются участки связывания с  $\text{Ca}^{2+}$ , гомологичные таковым других кальцийсвязывающих белков. Их взаимодействие с кальцием необходимо для обеспечения связи с фибронектином. Фосфорилирование рецепторов приводит к утрате ими сродства и к фибронектину, и к талину. Последний через винкулин и особый белок молекулярной массой 82 кДа связывается со структурами, построенными из фибриллярного актина (рис. 26, Б). Рецепторы к фибронектину участвуют в процессах дифференцировки клеток; так, у эритробластов и лимфобластов они имеются, а у зрелых, циркулирующих в крови форм интегриновые рецепторы уже не обнаруживаются.

В процессе прикрепления клетки рецепторы перемещаются к местам контакта с субстратом, образуя здесь скопления (рис. 26, А). В

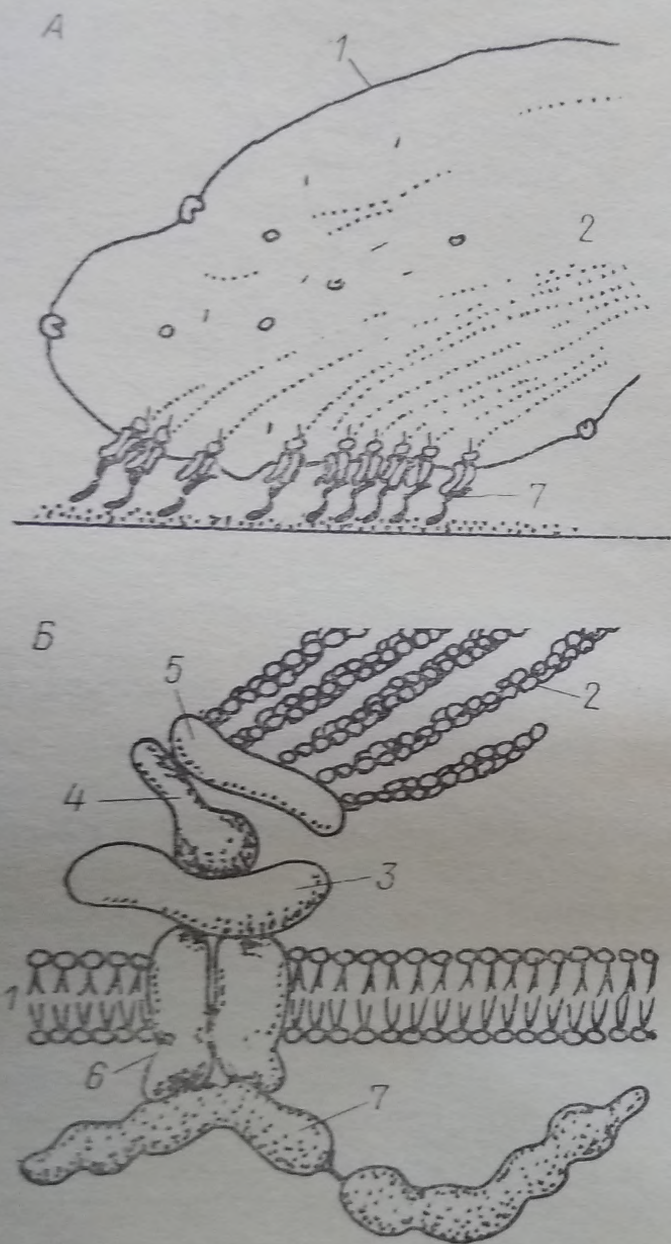


Рис. 26. Организация фокального контакта на клеточном (А) и надмолекулярном (Б) уровнях.

1 — плазматическая мембрана, 2 — F-актин, 3 — талин, 4 — тензин, 5 — винкулин, 6 — интегриновый рецептор, 7 — фибронектин.

этих областях обнаруживаются и гликолипиды ганглиозиды, по-видимому, также принимающие участие в рецепции фибронектина.

Как отмечалось выше, клетки прикрепляются к субстрату не



всей поверхностью, а отдельными ее участками. Эти участки диаметром 10—15 нм носят название фокальных контактов, или адгезивных пластинок (рис. 26). В области фокальных контактов образуется характерный структурированный цитоскелет, состав которого входят три его основных компонента: микрофибриллярная и микротрубочковая системы и система промежуточных филаментов. Ведущую роль в сборке этого локального цитоскелета играет, по-видимому, микрофибриллярная система, изменения в которой в первую очередь и индуцируются в результате задействия рецепторов к фибронектину. Для нормального образования фокального контакта необходимы и другие компоненты цитоскелета — без их участия формирование микрофибриллярной системы происходит значительно медленнее. Таким образом, на этом примере мы видим, что все субсистемы поверхностного аппарата — надмембранные структуры, мембрана и субмембранная часть периферической гиалоплазмы — по-разному, но в составе единой системы обеспечивают взаимодействие клетки с субстратом. При этом не только клетка действует на субстрат, но и субстрат вызывает изменения и в цитоскелете, и в поведении клеток в организме.

Значение взаимодействия субсистем поверхностного аппарата для осуществления процессов прикрепления клетки и перемещения ее по субстрату особенно ярко проявляется при сопоставлении поведения культивируемых *in vitro* нормальных и малигнизированных фибробластов. Последние с большим трудом прикрепляются к субстрату. Анализ ультраструктуры поверхностного аппарата малигнизированных клеток показал, что в их периферической гиалоплазме отсутствуют организованные микротрубочки и микрофибриллы (рис. 24, E). Тем не менее, эти клетки способны образовывать нормальные опорно-сократимые структуры. Выяснилось, что малигнизированные клетки вырабатывают мало фибронектина; если добавить его к среде, то в клетках образуется сеть актиновых филаментов, т. е. присутствие фибронектина является сигналом к сборке сократимых структур. Очевидно, что в результате малигнизации происходит изменение их рецепторного аппарата, приводящее к нарушению нормальных взаимодействий между тремя субсистемами поверхностного аппарата. А это, в свою очередь, и обуславливает резкое изменение поведения клеток.

Аналогичные закономерности установлены и в поведении культивируемых *in vitro* нормальных и малигнизированных эпителиальных клеток. Если нормальные клетки образуют однослойный пласт на дне сосуда, в котором они делятся лишь до того момента, пока не покроют все дно сосуда, то малигнизированные клетки утрачивают способность к контактному ингибированию деления. Они непрерывно размножаются и формируют беспорядочные многослойные структуры на дне сосуда.

Стимуляция пролиферации клеток, трансформированных, на-



пример, онкогеном  $v\text{-src}$  (вируса саркомы Рауса) связана с ослаблением клеточной адгезии в результате разрушения фокальных контактов. Такой же эффект обнаруживается при действии ростовых факторов на клетки, несущие протоонкоген  $c\text{-src}$ , очень сходный с онкогеном  $v\text{-src}$  по последовательности оснований. Белки, кодируемые этими генами ( $\text{src}$ -белки), являются рецепторами к ростовым факторам и обладают протеинкиназной активностью;  $\text{src}$ -белки, ковалентно связанные с липидами мембраны, располагаются с цитоплазматической стороны бислоя и обычно сосредотачиваются в области фокальных контактов. В задействованном состоянии они способны фосфорилировать ряд белков, в том числе и интегриновые рецепторы. Фосфорилирование интегриновых рецепторов снижает их сродство к талину, и к фибронектину, в результате чего и происходит разборка фокальных контактов (рис. 27).

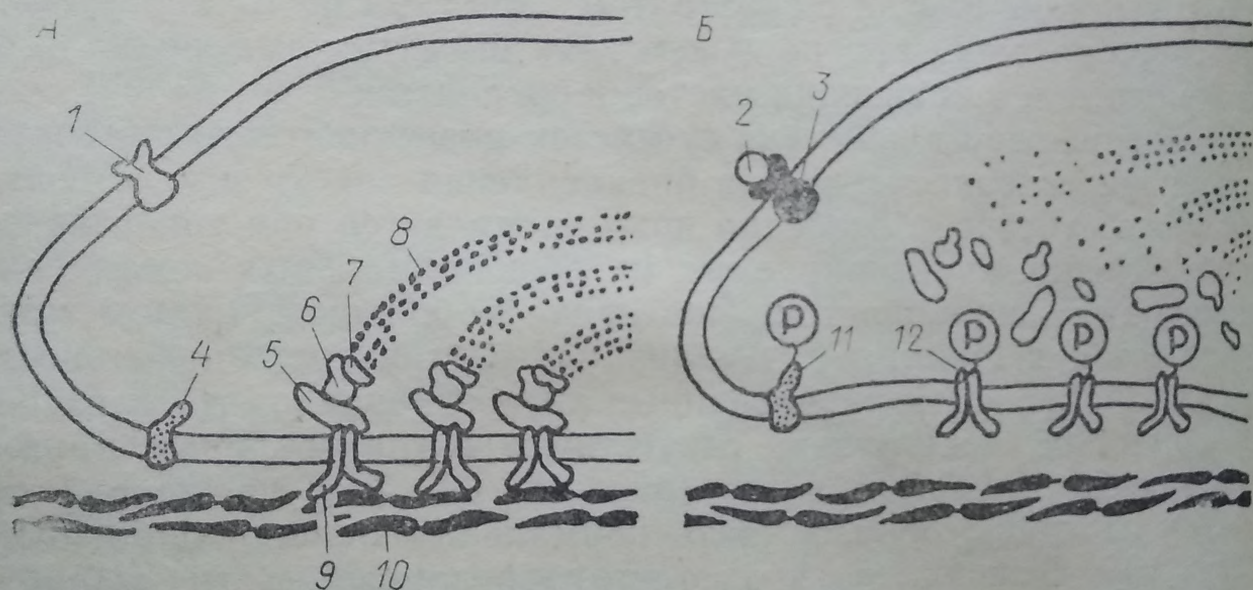


Рис. 27. Разборка фокальных контактов под действием ростового фактора (по: Alberts e. a., 1989).

А — клетка, не подвергавшаяся действию ростового фактора; Б — клетка после действия ростового фактора. 1 — рецептор к ростовому фактору; 2 — лиганд; 3 — задействованный рецептор; 4 —  $\text{src}$ -белок; 5 — талин; 6 — тензин; 7 — винкулин; 8 — актин; 9 — интегрин; 10 — фибронектин; 11 — фосфорилированный  $\text{src}$ -белок; 12 — фосфорилированный интегрин.

**Лектиновые рецепторы.** Начало современному этапу этих исследований положило открытие медиками особых белков растительного происхождения — лектинов, способных стимулировать вступление клеток в митоз. Впоследствии удалось выделить лектины из некоторых тканей высших животных.

Лектины состоят из четырех и более идентичных мономеров, несущих центры специфического связывания с сахарами. Связываясь с олигосахаридными участками интегральных гликопротеинов клеточных мембран, лектины вызывают закономерные изменения метаболизма клеток. Так, действие лектина фитог-



магглютини на лимфоциты периферической крови человека и млекопитающих вызывает эффект так называемой бластотрансформации. При этом лимфоцит превращается в лимфобласт; клетка и ее ядро значительно увеличиваются, гетерохроматин переходит в эухроматин и происходит ряд других изменений, приводящих к делению клеток.

На эффекте бластотрансформации основано широкое использование лектинов для получения митотически делящихся клеток, необходимых, например, при различного рода исследованиях хромосом.

Наиболее широкое распространение в практике экспериментально-цитологических исследований получили три лектина: фитогемагглютинин (ФГА), выделяемый из тканей бобовых растений, конканавалин А (Con A) и лектин WGA (wheat germ agglutinin) из семян ржи. В настоящее время лектины используются и как стимуляторы репродукции клеток, и как маркеры олигосахаридных рецепторов мембран. (Так, WGA имеет специфическое сродство к N-ацетилглюкозамину и т. д.)

Действие лектинов на клеточный метаболизм, по всей видимости, опосредуется через систему G-белков: уже через 20—30 мин после связывания рецепторов с лектинами происходит 20—30-кратное увеличение количества циклического ГМФ. Одновременно наблюдается повышение концентрации ионов калия в клетке и разжижение плазматической мембраны в результате изменения метаболизма фосфатидилинозитов (см. ниже). Однако механизмы передачи сигналов с лектиновых рецепторов на метаболический аппарат клетки все еще полностью не выяснены.

Лектиновые рецепторы имеют весьма широкое распространение. Они обнаружены у столь различных объектов, как клетки позвоночных животных, простейших, миксомицетов. Для того, чтобы установить точную локализацию этих рецепторов на поверхности клеток, лектины предварительно маркируют — связывают их или с флуоресцирующими красителями, или с каким-либо крупномолекулярным электронно-плотным веществом, например гемоцианином. Затем комплексом лектин—гемоцианин или лектин—краситель обрабатывают клетку. Наконец, можно связать молекулы разных лектинов (Con A, ФГА, WGA) с частичками коллоидного золота неодинаковой величины так, чтобы лектину каждого типа отвечали частицы металла определенного размера и, обработав этими комплексами клетку, получить картину расположения лектиновых рецепторов на поверхности клетки.

Таким образом, используя разные маркеры, можно наблюдать локализацию лектиновых рецепторов как на живых, так и на фиксированных клетках и под световым, и под электронным микроскопом. Правда, при интерпретации полученных таким способом результатов необходимо учитывать гетерогенность



лектиновых рецепторов и трудности их точной идентификации. У животных лектины играют важную роль в очистке крови: так, лектины мембран клеток печени специфически связываются с галактозой — концевым остатком асиалогликопротеинов, которые затем поглощаются гепатоцитами; таким же образом удаляются из кровяного русла гликопротеины с концевым маннозо-N-ацетилглюкозамином, специфически связывающиеся лектинами мембран макрофагов.

С помощью маркирования лектиновых рецепторов на разных клетках удалось обнаружить универсальное явление — перераспределение рецепторов на поверхности клетки (кэпинг-эффект). Суть его заключается в том, что распределенные диффузно по клеточной поверхности лектиновые рецепторы вскоре после присоединения к ним лектинов начинают образовывать многочисленные локальные скопления — пэтчи, которые затем могут собираться на одном из полюсов клетки, составляя здесь крупные агрегаты, или «шапочки» (кэпы). Строго говоря, образование крупных скоплений на одном полюсе происходит у клеток, находящихся в суспензии; у распластанных на субстрате клеток происходит формирование пэтчей и иногда стягивание комплексов лиганд — рецептор в центральную часть клетки. В дальнейшем такие шапочки чаще всего сбрасываются клеткой вместе с участком поверхностного аппарата. В редких случаях удавалось наблюдать проникновение конгломератов в клетку путем эндоцитоза.

В ряде случаев кэпинг-эффект может быть обусловлен своеобразной агглютинацией свободных участков лектиновых молекул. Однако у большинства клеток он, по-видимому, представляет собой активный биологический процесс, связанный с направленным перемещением задействованных лектинами рецепторов — интегральных гликопротеидов мембраны — при помощи субмембранной системы поверхностного аппарата клетки. Такие данные были получены, например, при использовании агентов, разрушающих компоненты цитоскелета: при нарушении стабильности этой системы кэпинг-эффект не наблюдается. Об участии цитоскелета в кэпинге говорят и результаты опытов с двойным маркированием клеточной поверхности: с помощью флуоресцирующих антител прослеживалась локализация и лектиновых рецепторов, и элементов субмембранной системы, например актина и миозина. При кэпинге свечение надмембранного и субмембранного компонентов наблюдалось в одних и тех же местах, т. е. перемещение рецепторов обеспечивалось деятельностью опорно-сократимой субмембранной системы. Кроме иммуноцитохимических и электронно-микроскопических методов о связи актиновых микрофиламентов с областью кэпа свидетельствуют и биохимические исследования компонентов цитоскелета. На лимфоцитах и лимфоидных клетках показано, что в кэпинге принимают участие актин, миозин,  $\alpha$ -актинин, спектрин, кальмо-



дулин, тубулин и другие компоненты субмембранной системы. Мутанты *Dictiostelium*, лишенные миозина, в отличие от клеток дикого типа не способны к кэпингу поверхностных рецепторов.

Такие факты — это еще один яркий пример проявления единства всех субсистем поверхностного аппарата в процессе его функционирования. Ведь в активном шапочкообразовании принимают участие и олигосахаридный компонент надмембранного гликокаликса, и интегральные белки мембраны, и наконец, опорно-сократимая система субмембранного аппарата. Сшитые лигандами мембранные белки взаимодействуют с компонентами цитоскелета. Однако тонкие механизмы этого взаимодействия до сих пор остаются невыясненными. Неясно также насколько универсален механизм кэпинга — зависит ли он от типа клеток или рецепторов.

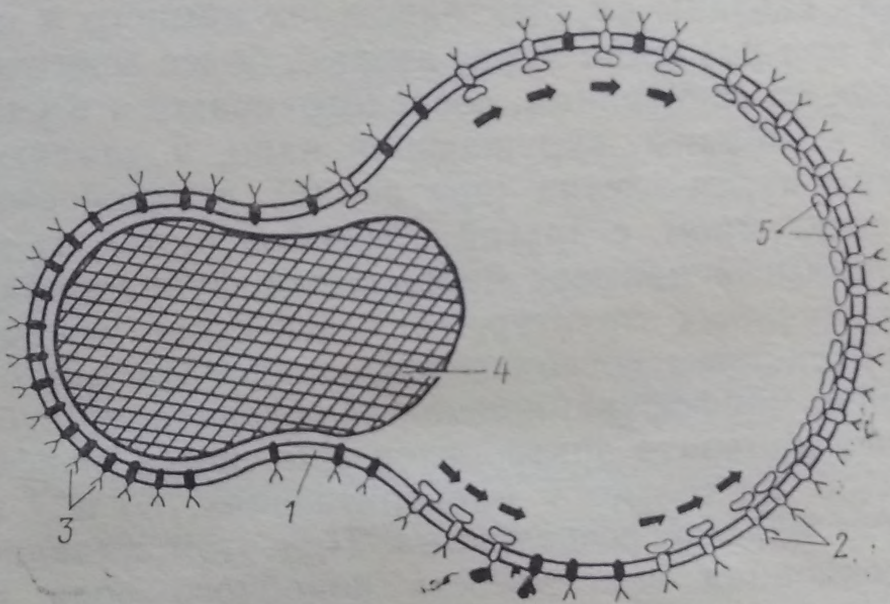


Рис. 28. Перераспределение белков в мембране эритроцита (показано стрелками) на начальных стадиях элиминации ядра.

1 — плазматическая мембрана; 2 — рецепторы, связанные с периферическим цитоскелетом; 3 — «свободные» рецепторы; 4 — ядро; 5 — спектрин.

Интересные изменения рецепторного аппарата клеток в эритропоэзе удалось наблюдать с помощью лектина Con A (рис. 28). На начальных этапах дифференцировки у гемоцитобластов и эритробластов имеется относительно небольшое число рецепторов Con A. Затем у полихроматофильных и особенно у эозинофильных эритробластов количество их в поверхностном аппарате заметно возрастает. На заключительном этапе дифференцировки при подготовке к элиминации ядра происходит перераспределение рецепторов — в этот период конканавалиновые рецепторы сосредоточиваются в тех участках плазматической мембраны, которая будет удалена вместе с ядром. В остальной же ее части, составляющей собственно поверхностный аппарат формирующихся эритроцитов, количество конканавалиновых рецепторов резко уменьшается. Клеточные фрагменты, содержащие



элиминированные ядра, фагоцитируются макрофагами красного костного мозга, реагирующими на рецепторы, сконцентрированные в плазматической мембране фрагментов эритробластов.

Таким образом, изменение распределения интегральных белков плазматической мембраны в процессе формирования эритроцитов имеет вполне определенный биологический смысл. Несомненно также, что активное сосредоточение лектиновых рецепторов в конкретном участке плазматической мембраны происходит при помощи опорно-сократимой субмембранной системы. Подтверждением этому служат данные, полученные маркированием спектрина флуоресцирующими антителами. На последнем этапе дифференцировки эритроцита свечение наблюдается лишь по периферии собственно эритроцита; в области плазматической мембраны, окружающей элиминирующееся ядро, свечения нет. По-видимому, существуют два типа рецепторов к Con A. Одни связаны со спектрином, их немного и они остаются в клетке при удалении ядра; вторые, более многочисленные и не связанные со спектрином, сосредоточиваются в участке плазматической мембраны, окружающей ядро, и удаляются вместе с ним. Таким путем клетка (эритроцит), с одной стороны, обогащается спектрином, с другой — освобождается от ядра. И на этом своеобразном примере проявляется функциональное единство надмембранных структур, плазматической мембраны и субмембранной системы поверхностного аппарата клеток.

Изменения морфофункциональной организации субсистем поверхностного аппарата эритроцитов в процессе дифференцировки происходят не только у млекопитающих, но и у представителей других классов позвоночных. При этом выявляется большая эволюционная пластичность подобного рода изменений. Так, обогащение поверхностного аппарата спектрином у ядерных эритроцитов многих классов позвоночных осуществляется не с помощью его перераспределения, как у млекопитающих, а в результате продолжительного и интенсивного синтеза спектрина в ходе дифференцировки клеток.

**Система G-(ГТФ-зависимых) белков.** Помимо многообразных специфических рецепторов в плазматической мембране имеется универсальная для многих эукариотных клеток система ГТФ-связывающих, или G-белков.

В плазматической мембране локализованы рецепторы, действие которых опосредуется так называемыми вторичными мессенджерами. Одним из наиболее изученных вторичных мессенжеров является циклический АМФ (цАМФ) (рис. 29). Когда соответствующий лиганд (скажем, адреналин) взаимодействует с рецептором, изменяется конформация молекулы последнего. Это, в свою очередь, вызывает изменение конфигурации специфического G-белка, также локализованного в мембране, который теперь может связывать ГТФ. Связавший ГТФ G-белок вновь изменяет свою конфигурацию: в «новом» состоянии он уже мо-



жет активировать аденилатциклазу — следующий компонент системы, также локализованный в мембране. Активированная аденилатциклаза переводит АТФ в цАМФ, который связывается с регуляторной субъединицей цитоплазматического фермента протеинкиназы А, в результате чего каталитическая субъединица фермента может выполнить свою функцию — фосфорилирование определенных белков. Таким образом работают так называемые стимулирующие рецепторы. Существуют и ингибирующие рецепторы, которые после получения сигнала через специальные G-белки, также меняя конформацию, оказывают ингибирующее действие на аденилатциклазу.

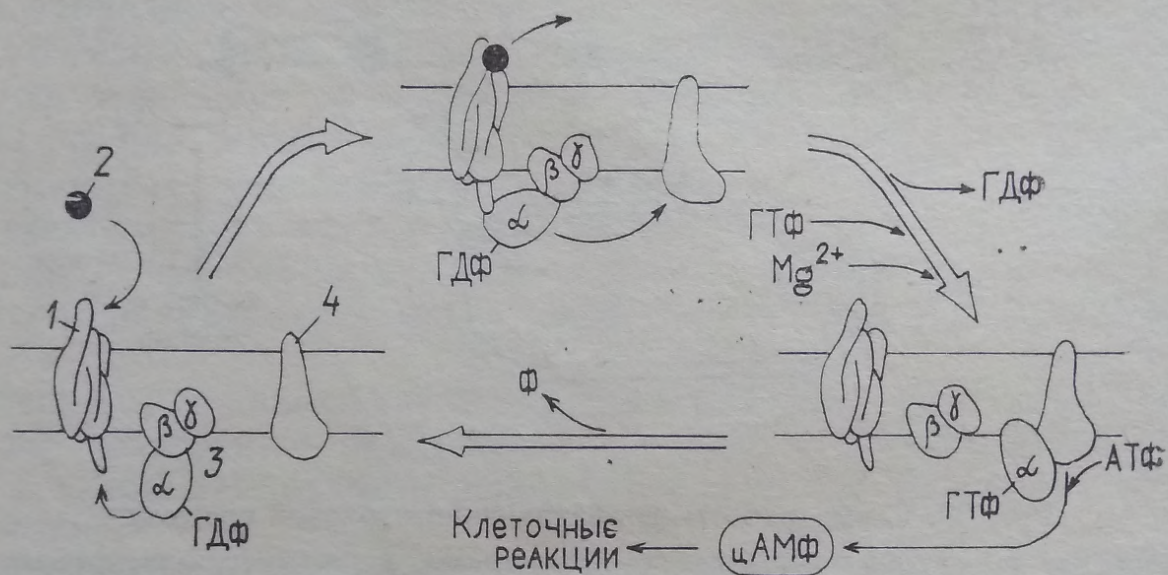


Рис. 29. Схема работы аденилатциклазной системы.

1 — рецептор, 2 — лиганд, 3 — G-белок, 4 — аденилатциклаза. Объяснения в тексте.

Рецепторы описанного типа располагаются в цитоплазматической мембране скелетных мышц, жировых клеток, клеток сердечной мышцы, кишечника и т. д., регулируя распад гликогена и жиров, частоту сокращения сердца, секрецию жидкости и др.

Другой путь передачи сигнала, при котором также используются вторичные мессенджеры — это так называемый фосфатидилинозитоловый путь (рис. 30).

Начальные этапы этого пути сходны с цАМФ — опосредованной трансмембранной сигнализацией. Под действием соответствующего сигнала рецепторы плазматической мембраны меняют конформацию и передают сигнал на G-белок, который активирует расположенный в мембране фермент фосфолипазу С. Она гидролизует фосфолипид фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат, локализованный преимущественно в цитоплазматической части билипидного слоя. Под действием фосфолипазы С из фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата образуются два продукта — инозитолтрифосфат, перемещающийся в цитоплазму, и диацилглицерол, остающийся в мембране. Диацилглицерол активирует мембранный фермент протеинкиназу С, которая фосфорили-



рует ряд белков, а инозитолтрифосфат освобождает кальций из внутриклеточного депо, в частности из эндоплазматической сети. Кальций, в свою очередь, принимает участие в регуляции целого ряда клеточных процессов. Таким образом действуют рецепторы к ацетилхолину (мускариновая рецепция), к факторам роста, субстанции К и т. д.

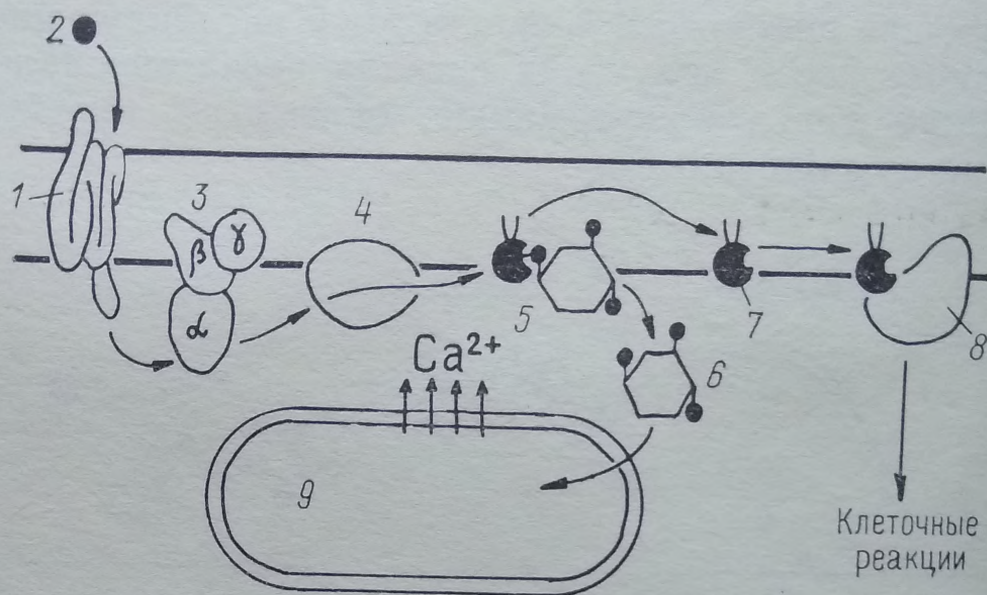


Рис. 30. Схема работы фосфатидилинозитоловой системы.

1 — рецептор, 2 — лиганд, 3 — G-белок, 4 — фосфолипаза, 5 — фосфатидилинозитолдифосфат (PI P<sub>2</sub>). 6 — инозитолтрифосфат (Ins P<sub>3</sub>), 7 — диацилглицерол, 8 — протеинкиназа С, 9 — депо Ca<sup>2+</sup>. Объяснения в тексте.

Все рецепторы этого класса передают сигналы через связывающие ГТФ G-белки. Имеется интересная разновидность G-белков — трансдуцин, работающий в системе зрительного анализатора. Расположенный в плазматической мембране палочки родопсин («рецептор») под действием светового сигнала активирует трансдуцин, который связывается с ГТФ и, меняя при этом свою конформацию, активирует фосфодиэстеразу, которая гидролизует циклический ГМФ и «раскрывает» его кольцевую молекулу. Циклический ГМФ поддерживает натриевые каналы мембраны фоторецептора в открытом состоянии, а «раскрытый» ГМФ способствует закрытию каналов, что вызывает гиперполяризацию мембраны и возникновение нервного импульса.

Сопоставляя компоненты этих систем, можно обнаружить между ними значительное сходство. Так, рецепторы, работающие через G-белки, обычно содержат семь трансмембранных доменов и имеют районы гомологии в цитоплазматических участках молекулы. Все известные G-белки, включая и трансдуцин, состоят из трех субъединиц — α-, β-, γ-, достаточно консервативных и сходных у филогенетически отдаленных организмов (особенно в ГТФ-связывающих участках). Определенная эволюционная консервативность характерна и для участка, связывающего



рецепторы. Показано, что точечная мутация в этой области (замена аргинина на пролин) приводит к потере G-белком активности — он уже не активируется рецептором.

Однако в составе G-белков есть и различия. По-видимому, они и определяют некоторую специфичность взаимодействия рецепторов с G-белками. Этот вопрос нуждается в дальнейшем исследовании, как и вопрос о точном расположении и взаимодействии субъединиц G-белков в мембране.

### 2.3.2. ТРАНСПОРТ В МЕМБРАННОЙ УПАКОВКЕ

Своеобразной и относительно хорошо изученной в структурно-химическом плане разновидностью мембранного транспорта является транспорт в мембранной упаковке. Естественно, что специфические черты такого транспорта наиболее ярко обнаруживаются в тех условиях, когда он играет существенную роль в жизнедеятельности клеток (простейшие) или в их специальной функции (дифференцированные клетки многоклеточных организмов — пищеварительные и секреторные клетки, фагоциты и др.).

Процессы транспорта в мембранной упаковке делятся на две большие категории — эндоцитоз и экзоцитоз — в зависимости от того, в каком направлении переносятся вещества (в клетку или из клетки).

**Эндоцитоз.** Так называется процесс поглощения веществ клеткой. В 70-е годы различали три разновидности эндоцитоза: фагоцитоз, макро- и микропиноцитоз (рис. 31). Как правило, при фагоцитозе поглощаются частички диаметром  $\geq 1$  мкм, при макропиноцитозе — 0,2—0,3 мкм, а при микропиноцитозе — около 70 нм. Суть процесса эндоцитоза — образование при контакте с клеткой какого-либо пригодного для поглощения субстрата эндоцитозного пузырька, который отшнуровывается от плазматической мембраны и поступает в клетку, где и сливается с лизосомой (дальнейшие стадии внутриклеточного пищеварения будут подробно рассмотрены ниже).

Эндоцитозный пузырек может образовываться разными способами. При фагоцитозе пузырек формируется путем обволакивания фагоцитируемой частички короткими отростками клетки (рис. 31, Б). Естественно, что в этом процессе принимает участие не только поверхностный аппарат с его опорно-сократимой системой, но и периферические участки цитоплазмы.

Макропиноцитоз осуществляется впячиванием плазматической мембраны в месте контакта с инородным телом (рис. 31, А). Формирование пиноцитозного пузырька и его отшнуровывание происходят при активном участии субмембранного сократимого аппарата. Однако в отличие от фагоцитоза при макропиноцитозе не наблюдается активного перемещения периферической цитоплазмы клетки.



Процессы фагоцитоза и макропиноцитоза блокируются ингибиторами дыхания, гликолиза и окислительного фосфорилирования, а также веществами, разрушающими микротрубочки и микрофиламенты субмембранной системы, — колхицином и цитохалазинами.

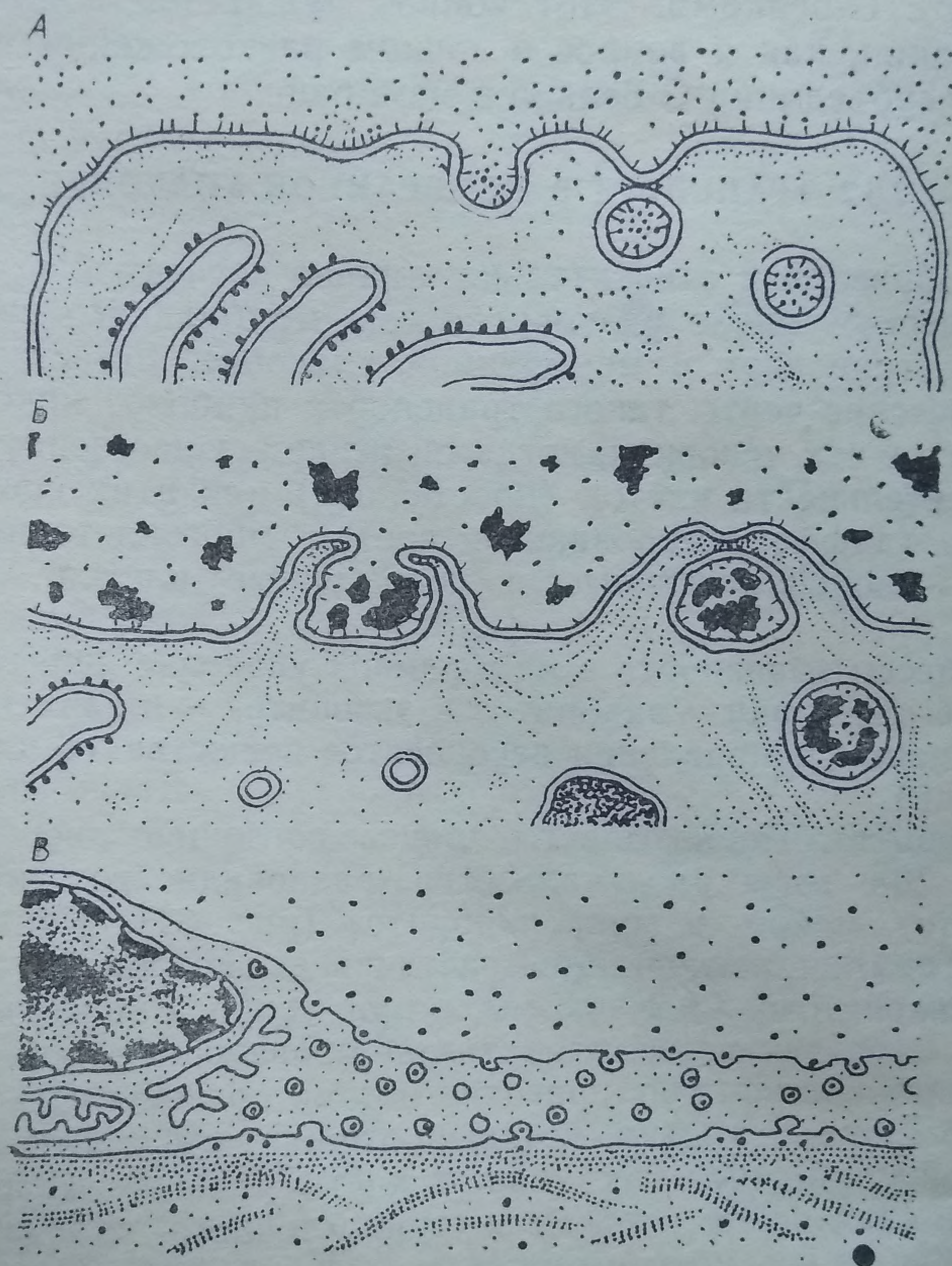


Рис. 31. Транспорт веществ в мембранной упаковке.

А — пиноцитоз, Б — фагоцитоз, В — транцитоз.

Интересный вариант организации процессов пиноцитоза обнаруживается в клетках кишечного эпителия новорожденных млекопитающих, взрослых клещей и некоторых пластинчатожабных моллюсков. В пищеварительных клетках кишечных эпителиев этих животных на определенной стадии пищеварительного цикла формируются особые мембранные структуры, состоящие из одной или нескольких крупных вакуолей и системы канальцев и цистерн — постоянные пиноцитозные комплексы. Очевидно, что образование столь сложных структур при макропино-



питозе имеет значение для более совершенного и дифференцированного поглощения веществ из внешней среды.

Микропиноцитоз, или транскитоз, отличается от двух других разновидностей эндоцитоза рядом принципиальных особенностей (рис. 31, В). Во-первых, этот процесс осуществляется в основном плазматической мембраной, без участия субмембранного аппарата гиалоплазмы. Он не требует затраты энергии и не блокируется агентами, ингибирующими деятельность субмембранной опорно-сократительной системы поверхностного аппарата клетки. Однако процесс микропиноцитоза прекращается при значительном понижении температуры; это происходит, по-видимому, в результате уменьшения степени жидкостности плазматической мембраны. При микропиноцитозе поглощенные пузырьки обычно не взаимодействуют с лизосомами, а служат в основном для транспортировки веществ с одной поверхности клетки на другую. Вероятно, этот процесс нужен для медленного прохождения крупных молекул через клетку. Таким путем осуществляется, в частности, транспорт веществ через клетки эндотелия кровеносных сосудов у позвоночных животных.

**Эндоцитоз, опосредованный рецепторами.** Единство структур поверхностного аппарата эукариотных клеток, его исключительно важная роль в жизнедеятельности клеток и взаимосвязь с метаболическим аппаратом цитоплазмы особенно ярко проявляются в процессе эндоцитоза, опосредованного рецепторами, открытого в начале 80-х годов. Этот тип эндоцитоза представляет собой транспорт в мембранной упаковке большой группы специфических соединений, для каждого из которых имеются свои рецепторы. Он протекает за считанные секунды или минуты и обеспечивает поступление в клетку или транспорт через нее таких веществ, как материнские иммуноглобулины, ряд полипептидных гормонов, липопротеинов, железосодержащих белков и т. д. (рис. 32).

Рецепторами для этих веществ служат специальные гликопротеины, обладающие одним общим свойством: в задействованном состоянии они собираются в кластеры в определенных участках мембраны — ямках, в субмембранном цитозоле которых имеется особый белок клатрин. Полимеризуясь, он образует так называемое «опушение» (или «окаймление») этих ямок. Из них впоследствии образуются «окаймленные» (coated) пузырьки, или везикулы. Участки мембраны с такими субмембранными структурами, например, у фибробластов в культуре, занимают от 0,5 до 2% их поверхности и имеют 20 нм в длину и 4—6 нм в ширину. Они выявлены у многих метазойных клеток (даже в таких специализированных структурах, как кровяные пластинки) и у всех многоклеточных растительных организмов — от водорослей до высших растений. Не обнаружены они лишь у безъядерных эритроцитов.

«Окаймленные», или «опушенные», мембраны и пузырьки



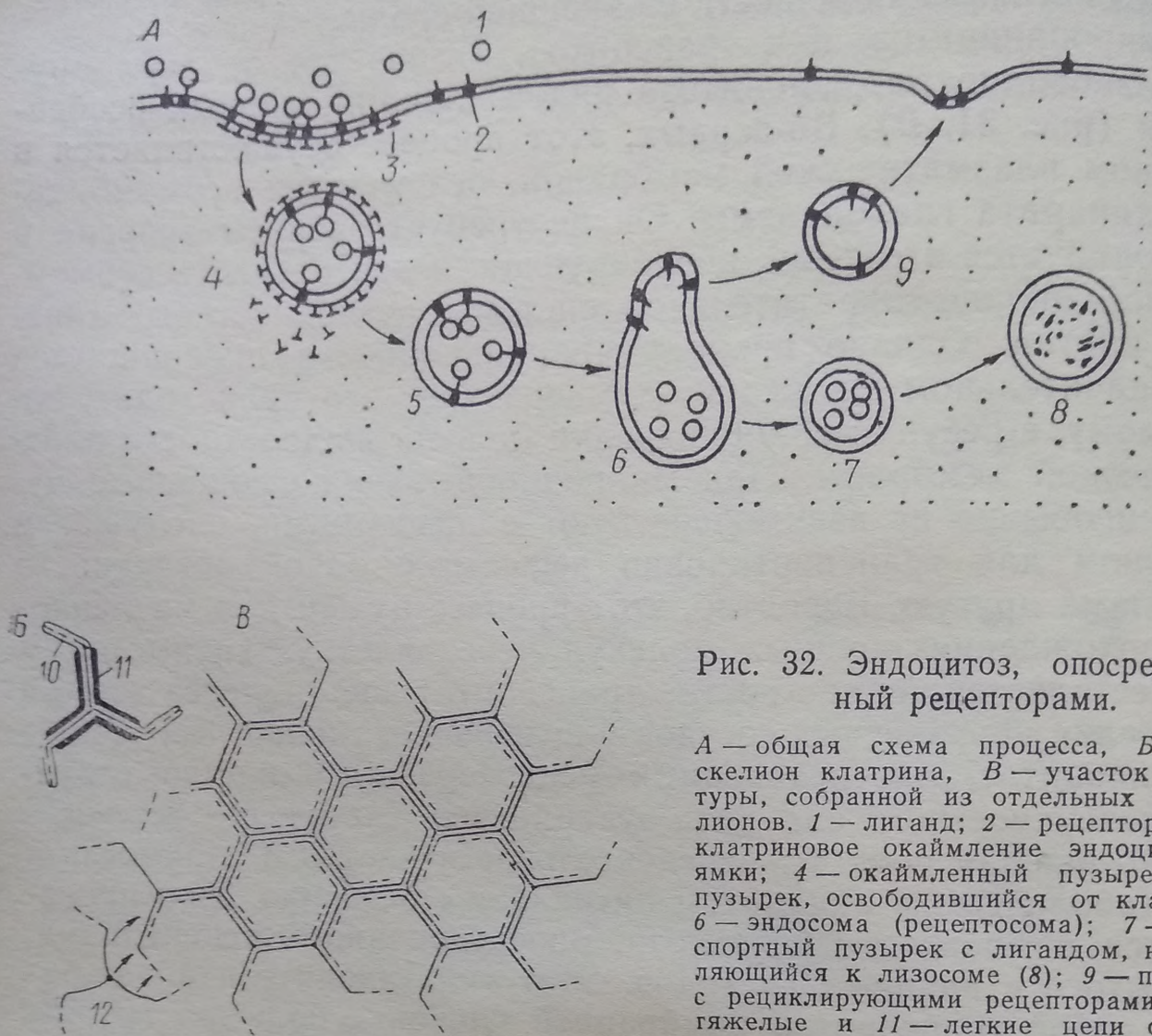


Рис. 32. Эндоцитоз, опосредованный рецепторами.

А — общая схема процесса, Б — трискеллион клатрина, В — участок структуры, собранной из отдельных трискеллионов. 1 — лиганд; 2 — рецепторы; 3 — клатриновое окаймление эндоцитозной ямки; 4 — окаймленный пузырек; 5 — пузырек, освободившийся от клатрина; 6 — эндосома (рецептосома); 7 — транспортный пузырек с лигандом, направляющийся к лизосоме (8); 9 — пузырек с рециклирующими рецепторами; 10 — тяжёлые и 11 — лёгкие цепи отдельного трискеллиона (12).

имеются не только в области плазматической мембраны, но и в районе аппарата Гольджи (подробнее см. ниже).

Рецепторы, участвующие в эндоцитозе этого типа, весьма многочисленны, их уже обнаружено у млекопитающих около 20. Они негомологичны и не содержат даже гомологичных участков. Их величина варьирует от 38 до 542 аминокислотных остатков.

Такие рецепторы «прошивают» мембрану один раз: некоторые из них обращены наружу С-концами, а другие N-концами. Отличаются они и сайтами гликозилирования белковой цепи. Большинство этих рецепторов синтезируется самими клетками, а некоторые, например рецептор к липопротеинам низкой плотности (ЛНП), вырабатывается в печени, циркулирует в плазме крови и встраивается в мембраны клеток разных тканей.

Сейчас еще нет полной ясности в вопросе о том, сосредоточены ли все рецепторы в «окаймленных» ямках еще до встречи с лигандами, или же их задействование не только стимулирует эндоцитоз, но и вызывает активное смещение рецепторов в район «окаймленных» ямок.

Основным субмембранным белком, образующим характерное «опушение» ямок и пузырьков, является клатрин. Он существу-



ет в клетке в двух формах—свободный мономерный фонд в гиа-  
лоплазме и полимеризованный, в виде «опущения» в комплексе  
с другими белками. Молекула клатрина имеет весьма харак-  
терный вид так называемого «трискелиона» — фигуры с тремя  
«ногами», каждая из которых образована тяжелой цепью клат-  
рина (рис. 32, Б, В). Все они соединяются в центре молекулы,  
за их самосборку отвечают концы тяжелых цепей и их прокси-  
мальные участки. Кроме того, имеются и три легкие цепи  $\alpha$ - и  
 $\beta$ -типа. Тяжелые цепи молекулярной массой порядка 180—  
190 кДа сходны у филогенетически отдаленных видов, т. е. эво-  
люционно консервативны. Легкие цепи имеют молекулярную  
массу около 30—40 кДа;  $\alpha$ - и  $\beta$ -типы легких цепей существен-  
но различаются. Соотношения легких  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей в трискелио-  
нах различны, например, в нервных клетках 1 $\alpha$ - : 2 $\beta$ -, в триске-  
лионах ретикулоцитов присутствуют только  $\alpha$ -цепи. Легкие цепи  
не участвуют в самосборке сложной молекулы, их конкретная  
роль пока неизвестна. Для легких цепей характерна некоторая  
тканеспецифичность, так, например, в  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепях нервных кле-  
ток имеются вставки аминокислотных последовательностей, от-  
сутствующих у лимфоцитов. При образовании соответствующих  
иРНК происходит альтернативный сплайсинг.

Для сборки клатринового «опущения» необходимы дополни-  
тельные белки 50—55 кДа и 100—120 кДа. Белок 50 кДа явля-  
ется субстратом для киназы «окаймленных» пузырьков и сходен  
со вспомогательными МАР-белками микротрубочек. Возможно,  
он способствует взаимодействию «окаймленных» пузырьков с  
микротрубочками или с чистым тубулином.

Тубулин обнаруживается в «окаймленных» пузырьках в сле-  
дующем соотношении: 22 молекулы  $\alpha$ -тубулина и 22 молекулы  
 $\beta$ -тубулина на 33 трискелиона клатрина. Такое количество тубу-  
лина в составе структуры вряд ли можно считать случайным.  
В этих же пузырьках имеется и 18 молекул  $\tau$ -подобного белка  
(50 кДа). По-видимому, дополнительные белки играют регули-  
рующую роль.

Сборка и разборка клатринового «опущения» *in vitro* и, воз-  
можно, *in vivo* очень зависит от значения рН среды.

В последнее время обнаружен белок, который обуславливает  
разборку клатринового опущения — так называемая «раздеваю-  
щая» АТФаза (см. ниже). Он принадлежит к семейству белков  
теплового шока, имеет молекулярную массу 70 кДа и обладает  
АТФазной активностью. Связываясь с клатрином, этот белок не  
дает ему возможности образовывать полимерные структуры.

В процессе «клатринового» эндоцитоза (рис. 32, А) иногда  
происходит возвращение мембраны с рецепторами на поверх-  
ность клетки — своеобразная рециркуляция, или рециклирова-  
ние, рецепторов. Судьба лиганда тоже может быть разной —  
от полной или частичной деградаци в лизосомах до транспорта  
через клетку внутрь организма. Подробно эти вопросы будут



обсуждаться в разделе, посвященном мембранным органоидам клетки. Здесь отметим только, что в процессе эндоцитоза, опосредованного рецепторами, имеет место сортировка поступающих в клетку веществ.

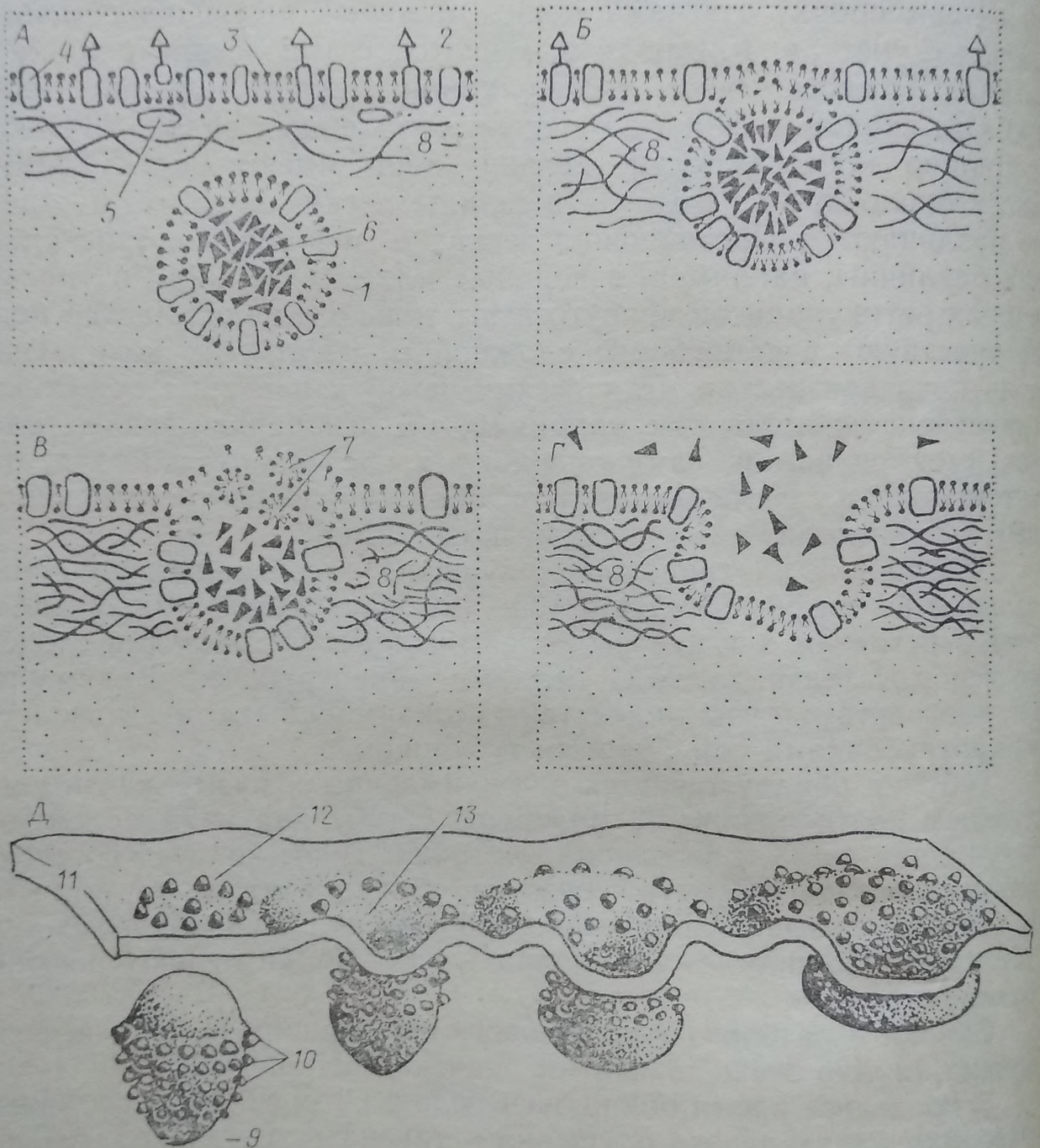


Рис. 33. Схема процессов экзоцитоза.

А—Г — последовательные стадии экзоцитоза, Д — экзоцитоз мукоциты инфузории. 1 — экзоцитозный пузырек; 2 — плазматическая мембрана; 3 — липиды мембраны; 4 — интегральные и 5 — периферические белки мембраны; 6 — содержимое экзоцитозного пузырька; 7 — липидные мицеллы, образующиеся в процессе слияния мембран; 8 — микрофибриллярный аппарат; 9 — мукоцита; 10 — правильно ориентированные белковые глобулы на поверхности мукоциты; 11 — плазматическая мембрана; 12 — розетка глобул на плазматической мембране; 13 — участок контакта мукоциты с плазматической мембраной.

**Экзоцитоз.** Этот процесс, обратный эндоцитозу, обуславливает транспортировку веществ, заключенных в мембранные пу-



зырьки, во внешнюю для клетки среду (рис. 33). Обычно таким образом транспортируются различные секреторные гранулы и продукты экскреции. При типичном экзоцитозе окруженная мембраной гранула активно перемещается к поверхностному аппарату клетки благодаря деятельности опорно-сократимой системы. В месте ее соприкосновения с плазматической мембраной происходит деполимеризация опорно-сократимых структур, в результате чего мембрана, окружающая гранулу, может вступить в непосредственный контакт с плазматической мембраной клетки. В области контакта осуществляется переориентация липидных молекул таким образом, что из двух контактирующих мембран в конце концов формируется одинарная мембрана, которая вскоре разрушается. Мембрана экзоцитозного пузырька встраивается в плазматическую мембрану клетки. При этом перераспределяются компоненты субмембранного опорно-сократимого аппарата и сокращаются микрофиламенты, что и обуславливает активное выталкивание содержимого экзоцитозного пузырька наружу и выравнивание клеточной поверхности на его месте (рис. 33, А—Г). Процесс экзоцитоза требует увеличения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в клетке; по-видимому, это связано с тем, что  $\text{Ca}^{2+}$  запускает сокращение микрофиламентов субмембранного аппарата.

Вопрос о том, существуют ли на плазматической мембране клеток определенные участки, где локализуется процесс экзоцитоза, далек от окончательного выяснения. Имеются данные, полученные на простейших, которые свидетельствуют в пользу такой точки зрения. Оказалось, что в плазматической мембране некоторых ресничных инфузорий есть определенные участки с правильным расположением крупных глобул. У мукоцист и трихоцист инфузорий, подходящих непосредственно к плазматической мембране, т. е. полностью готовых к выведению из клетки, на верхней части есть венчик из глобул интегральных белков. Именно такими участками и соприкасаются мембраны при контакте мукоцист или трихоцист с поверхностью клетки. При этом сливаются липидные участки плазматической мембраны и мембраны муко- или трихоцисты, ограниченные интегральными белками. По-видимому, здесь для экзоцитоза место заранее предопределено (рис. 33, Д).

При экзоцитозе секреторных гранул в тучных клетках позвоночных наблюдается следующее явление: сливающиеся мембраны (и плазматическая, и мембрана секреторной гранулы) как бы освобождаются от интегральных белков, в месте слияния белковые глобулы латерально перемещаются в плоскости мембраны и «расходятся» в разные стороны. Интересно отметить, что эти участки сливающихся мембран обогащены холестерином.

Еще одна модификация экзоцитоза отмечается в нейтрофилах. Эти клетки способны при определенных условиях выбра-



сывать лизосомы в среду. Существуют по крайней мере два механизма такого процесса. Один из них запускается малыми концентрациями  $\text{Ca}^{2+}$  и связан с активной деятельностью актин-миозиновой системы цитоплазмы (механизм ингибируется цитохалазином). При этом образуются небольшие выросты цитоплазмы, содержащие лизосомы, они отрываются и переходят в среду. Второй механизм запускается высокими концентрациями  $\text{Ca}^{2+}$ , он, по-видимому, связан с деятельностью системы микротрубочек, так как ингибируется колхицином. В этом случае плазматическая мембрана впячивается на довольно большое расстояние внутрь клетки, туда, где располагаются лизосомы. Они контактируют с мембраной и с помощью экзоцитоза выводятся наружу. При этом микротрубочки, вероятно, играют направляющую роль.

В экспериментах, поставленных на дрожжах и секреторных клетках млекопитающих, удалось выяснить некоторые механизмы регуляции секреции. Так, обнаружены белки, «ответственные» за процессы транспорта секреторных гранул в клетке. Оказалось, что они принадлежат к суперсемейству G-белков, рассмотренных выше при характеристике рецепторной функции поверхностного аппарата. Подробнее роль этих белков в транспорте секреторных гранул будет обсуждаться в разделе, посвященном мембранным органоидам, здесь же отметим лишь дискретный характер контроля за транспортными процессами. Некоторые белки отвечают за начальные этапы перемещения секреторных пузырьков. Другие белки обеспечивают конечные этапы такого перемещения вплоть до слияния их с плазматической мембраной.

Кроме того, на широком круге объектов удалось показать наличие двух основных типов выведения веществ из клетки. Первый из них — так называемая стимулируемая секреция — это экзоцитоз, осуществляемый в ответ на стимул, часто вызывающий повышение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  и воздействующий, вероятно, на G-белки, ответственные за конечные этапы перемещения секреторных гранул. Второй механизм — это конститутивная секреция — непрерывный процесс выведения веществ, интенсивность которого регулируется в небольших пределах (см. рис. 64).

Доказательством существования стимулируемой секреции является стимуляция экзоцитоза аналогами ГТФ и в отсутствие ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в нейтрофилах млекопитающих. При этом имеет место выведение только одного типа секреторных гранул, что указывает на возможность селективного контроля за процессами секреции.

В слиянии мембран секреторных гранул с плазматической мембраной принимают активное участие кальцийсвязывающие белки (S-100, кальпактины, кальмодулин и др.). Кроме ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , эти белки взаимодействуют и с фосфолипидами мембран.



На последних этапах экзоцитоза отчетливо выявляется роль цитоскелета. Действие цитохалазина стимулирует секрецию, при этом происходит локальное разрушение субмембранного микрофибрилярного цитоскелета, вероятно, это необходимо и в нормальных условиях, чтобы дать возможность мембранам контактировать друг с другом. Антитела к фодрину ингибируют секрецию, значит, периферический цитоскелет также играет какую-то роль на заключительных этапах экзоцитоза. Блокирует секрецию и колхицин: разрушая микротрубочки, он, вероятно, препятствует транспорту секреторных гранул.

### 2.3.3. ПОСТОЯННЫЕ МЕЖКЛЕТОЧНЫЕ КОНТАКТЫ

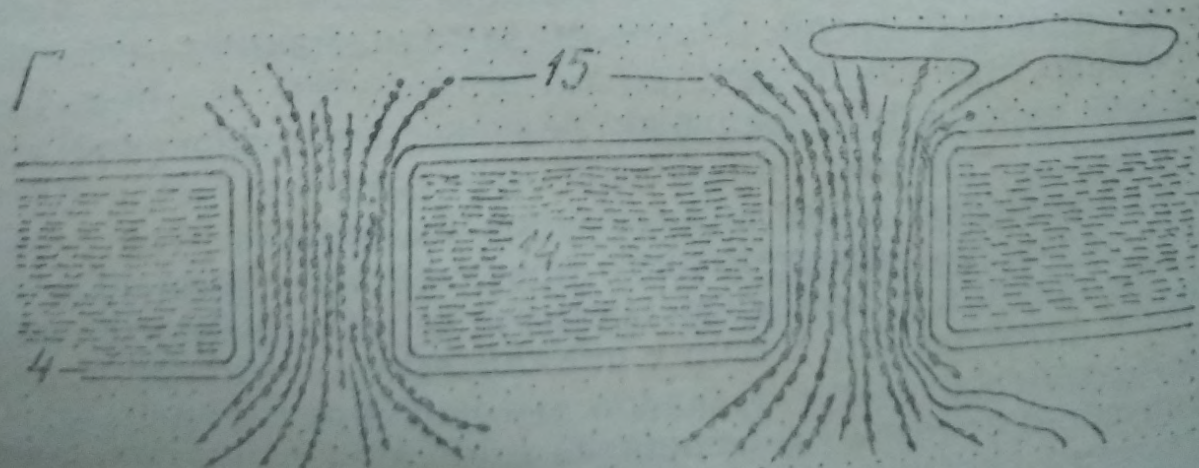
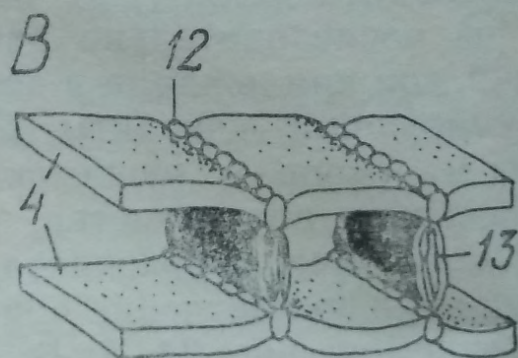
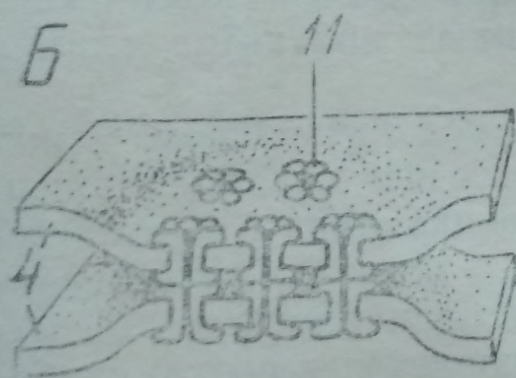
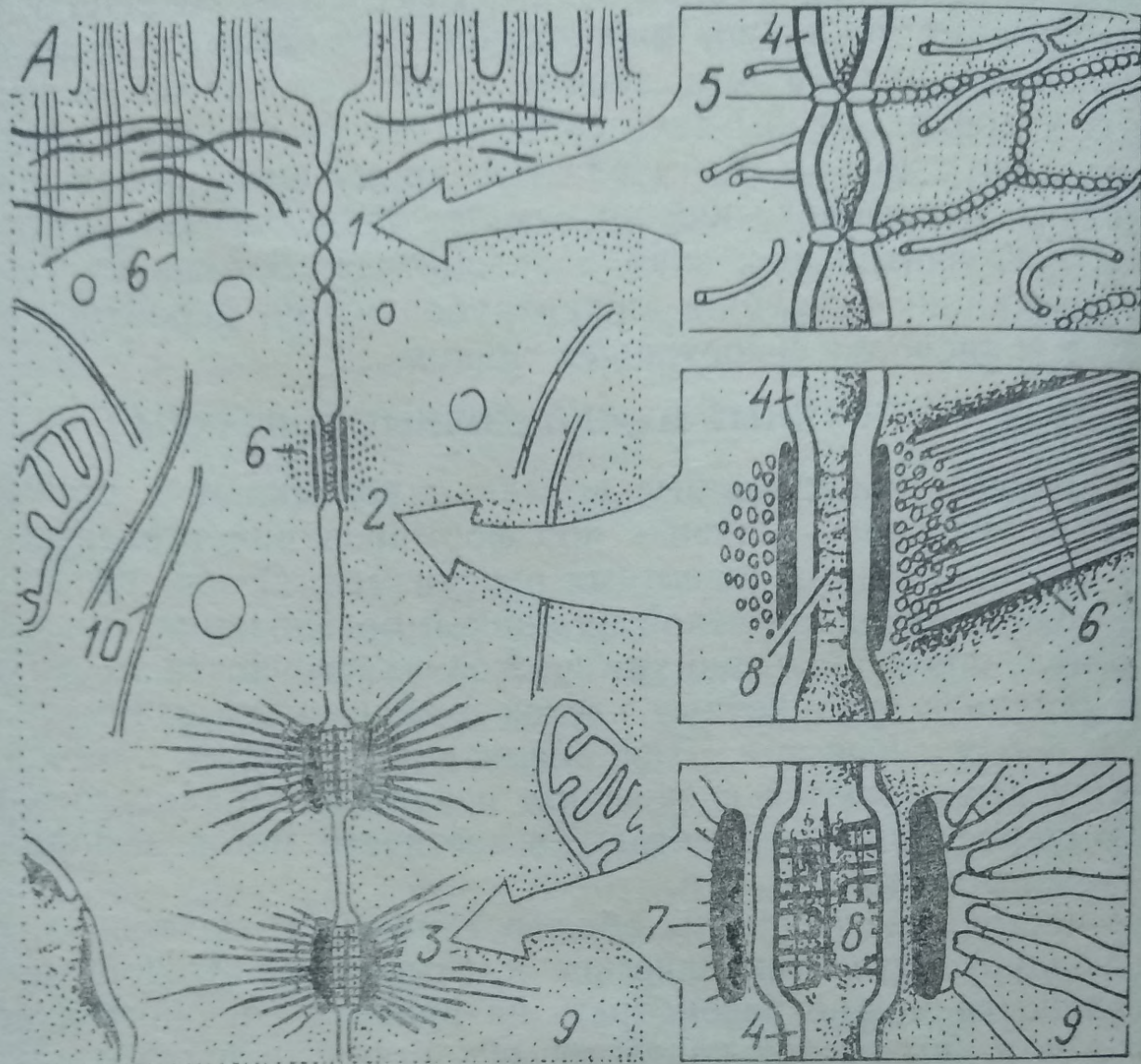
Постоянные межклеточные контакты возникают и приобретают исключительное значение при формировании тканевых систем у многоклеточных животных организмов. С общецитологической точки зрения изучение их тонкой организации способствует выявлению структурно-химической пластичности поверхностного аппарата эукариотных клеток и пониманию взаимосвязи его отдельных субсистем. Для анализа постоянных клеточных контактов используются адекватные и наиболее щадящие электронно-микроскопические методы, в частности метод замораживания—скалывания.

Все постоянные контакты общего характера делятся на три типа: изолирующие, механические и химические. Основные их разновидности можно рассмотреть на примере соединительного комплекса и химических контактов в клетках кишечного эпителия млекопитающих (рис. 34). Соединительный комплекс состоит из последовательно расположенных контактов типа зон слияния, зон прилегания и десмосом.

**Изолирующие контакты.** Опыты с использованием межклеточных маркеров — крупномолекулярных веществ, заполняющих межклеточные пространства, но не проникающих в клетки (гидроокись лантана, пероксидаза хрена), — показали, что основное функциональное значение зон слияния, или плотных контактов (tight junction; рис. 34, А, Г, Д), заключается в создании более или менее полной химической изоляции межклеточных пространств от внешней среды. Методом замораживания—скалывания выявлено, что такая цель достигается путем своеобразного «слипания» глобул интегральных белков плазматической мембраны соседних клеток; при этом в зоне слияния белки расположены сплошными переплетающимися полосками, что и обеспечивает изоляцию межклеточного пространства. Белковые глобулы укрепляются с помощью системы тонких фибрилл, находящихся в цитоплазме и идущих параллельно поверхности клетки. Такой тип контактов обладает высокой пластичностью.

Количество полосок слипающихся глобул определяется функциональными особенностями данного типа тканей. Их больше в тех тканях, где требуется более полная изоляция межклеточ-







ного пространства. К примеру, в эпителии мочевого пузыря амфибий, который характеризуется слабой проницаемостью (электрическое сопротивление его  $1000-2000 \text{ Ом} \cdot \text{см}^2$ ), имеется восемь изолирующих полосок, а в эпителии проксимального извитого канальца почки млекопитающих, где, как известно, проницаемость очень велика (сопротивление всего  $6 \text{ Ом} \cdot \text{см}^2$ ), обнаруживается одна такая полоска. Количество изолирующих полосок может меняться при изменении функциональной нагрузки клеток.

Контакты такого типа играют существенную роль не только в изоляции межклетников от внешней среды, но и в разграничении апикальной и базолатеральной частей асимметричных клеток, где это необходимо для обеспечения нормального функционирования интегральных белков-насосов плазматической мембраны, работающих в противоположных направлениях, как, например, во всасывающих клетках кишечного эпителия.

**Механические контакты.** В отличие от изолирующих контактов, в образовании и функционировании которых основную роль играет перестройка внутренней организации мембраны, в контактах механического типа основные изменения наблюдаются в надмембранных и субмембранных системах. Так, в обычных, или точечных, десмосомах расстояние между мембранами контактирующих клеток оказывается достаточно большим ( $22-35 \text{ нм}$ ). Здесь в результате гипертрофии и видоизменений надмембранного комплекса формируется волокнистый матрикс, который иногда имеет сложную структуру: в центральной части располагается пластинка, состоящая из мукопротеидных или белковых глобул, она связывается с мембранами клеток системой поперечных фибрилл. Весь этот комплекс укрепляется за счет образующихся в субмембранной гиалоплазме контактирующих клеток электронно-плотных пластинок и отходящей от них в поперечном направлении в глубь цитоплазмы системы фибриллярных структур, представляющих собой скелетные  $10 \text{ нм}$ -фибриллы опорно-сократимого аппарата гиалоплазмы.

Точечные (spot) десмосомы разбросаны в виде пятен по поверхности контактирующих клеток. Их физиологическая роль заключается в обеспечении механической связи между клетками и защите их мембран от деформации путем равномерного распределения нагрузки на весь клеточный пласт. Естественно, что наибольшее число таких десмосом характерно для тканей, выдерживающих высокие механические нагрузки. Значение точеч-

Рис. 34. Межклеточные контакты.

А — соединительный комплекс, Б — щелевое соединение, В — септальная десмосома, Г — плазмодесма. 1 — зона слияния; 2 — опоясывающая десмосома; 3 — точечная десмосома; 4 — плазматическая мембрана; 5 — интегральные белки плазматической мембраны в области зоны слияния; 6 — актиновые микрофиламенты; 7 — электронно-плотная пластинка цитоплазмы; 8 — структуры надмембранного комплекса; 9 —  $10 \text{ нм}$ -филаменты; 10 — микротрубочки; 11 — ионофорные белки; 12, 13 — интегральные белки плазматической мембраны (12) и мукопротеидный комплекс (13) септальной десмосомы; 14 — клеточная стенка; 15 — фибриллы плазмодесмы.



ных десмосом для поддержания целостности клеточного пласта очень велико; так, при некоторых кожных болезнях наблюдается сильное преждевременное сращивание клеток с поверхности пласта. При этом количество десмосом резко уменьшается.

Второй вид механических контактов соединительного комплекса — зона прилегания, или опоясывающая (поясковая -belt) десмосома, имеет несколько иную структуру. Расстояние между мембранами соседних клеток в зоне прилегания обычно меньше, чем в области точечных десмосом. В надмембранной части опоясывающей десмосомы отсутствует четко выраженная центральная пластинка, а фибриллы надмембранного комплекса имеют преимущественно продольное направление. В субмембранной цитоплазме также есть фибриллярные структуры, занимающие, однако, меньшую площадь, чем в обычных десмосомах. Большая часть этих фибрилл состоит из стабилизированных форм фибриллярного актина, что четко доказано в опытах с тяжелым меромизоином. Таким образом, в данном случае в формировании межклеточного контакта принимают участие сократимые белки субмембранного комплекса. Опоясывающие десмосомы, в отличие от точечных, располагаются в виде сплошных полосок (поясков) на всем протяжении контактирующих поверхностей клеток. Они передают на соседние клетки механическое напряжение, генерированное внутри клетки и связанное с изменением ее объема или каким-либо смещением в пласте.

Несмотря на то, что десмосомы представляют собой участки контактирующих клеток со сложной и стабильной морфологической организацией, они, так же как и зоны слияния, весьма динамичные структуры. Однако их пластичность проявляется не столько в видоизменении морфологии, сколько в способности к разборке и новообразованию. Десмосомы могут также уничтожаться клетками путем своеобразной фагоцитарной реакции; при этом принадлежащая одной из клеток «половина» десмосомы с небольшим участком прилегающей цитоплазмы оказывается поглощенной другой клеткой.

Третий тип механических межклеточных контактов характерен для тканей беспозвоночных животных и представлен большим количеством разновидностей так называемых септальных десмосом (рис. 34, E). Раньше им помимо механической связывающей функции приписывали и функции химических контактов. Однако при выделении септальных десмосом в достаточных для химического анализа количествах в их составе не обнаружено белков, способных обеспечивать трансмембранный транспорт низкомолекулярных соединений. В связи с этим принято считать, что септальные десмосомы беспозвоночных выполняют лишь механические функции. В них, в отличие от точечных десмосом позвоночных, нет выраженной субмембранной пластинки и слабее, чем в точечных десмосомах, представлена связывающая система промежуточных филаментов. Вместе с тем



в септальных десмосомах сильнее развиты надмембранные компоненты. Они представлены двумя закономерно расположенными связывающими структурами — белковыми и полисахаридными. Специфические белки этих структур на ряде объектов удалось выделить в чистом виде. Они не обнаруживают заметной гомологии с белками точечных десмосом.

**Химические контакты.** Последний функциональный тип контактов — контакты, обеспечивающие клеткам возможность обмена низкомолекулярными веществами. Это так называемые щелевые соединения (gap junction; рис. 34, В, Г). По принципу организации подобные контакты напоминают зоны слияния тем, что в участках соприкосновения клеток наблюдаются специфические изменения внутренней структуры самих мембран. Так, в щелевых соединениях имеет место непосредственное «слипание» двух белковых глобул — интегральных белков контактирующих мембран. Однако, в отличие от зон слияния, они не образуют сплошных полосок и относятся, по-видимому, к так называемым катионным или ионофорным белкам, обладающим способностью при определенных условиях пропускать ионы и низкомолекулярные соединения, обеспечивая переход веществ из клетки в клетку. На некоторых объектах эти белки относительно хорошо изучены и в структурном, и в химическом отношении. Они представляют собой типичные интегральные белки мембран, образующие комплексы из шести белковых глобул — так называемых коннексонов. Каждая глобула представлена белком коннексином, а их комплекс формирует ионный канал, контактирующий непосредственно с аналогичным ионным каналом соседней клетки.

Второй, весьма своеобразной разновидностью химических межклеточных контактов, являются так называемые плазмодесмы растительных клеток. Однако они представляют собой скорее не межклеточные контакты, а места своеобразного объединения клеток в надклеточную синцитиальную систему. В области плазмодесмы имеет место слияние плазматических мембран соседних клеток и цитоплазма одной клетки непосредственно сообщается с цитоплазмой другой. В этих участках выявлены фибриллы неизвестной природы (рис. 34, Ж).

\* \*

\*

Краткая характеристика современных представлений о морфофункциональной организации поверхностного аппарата показывает, что его можно рассматривать как целостную, но достаточно дифференцированную систему, сопоставимую по значению и сложности организации с двумя другими клеточными системами: цитоплазмой и ядром.

В морфофункциональной организации поверхностного аппарата сочетаются относительная консервативность его структур



с достаточно большой пластичностью, обуславливающей многообразие этих аппаратов в клетках разных организмов. Это проявляется в неравноценности отдельных субсистем поверхностного аппарата. Так, в противоположность надмембранным структурам, отличающимся чрезвычайным структурным и химическим разнообразием, две другие субсистемы — плазматическая мембрана и, в значительной мере, субмембранный цитоскелет — построены по единому плану, универсальному для всех эукариот. Вместе с тем консервативность двух последних субсистем поверхностного аппарата вовсе не абсолютна, и сам принцип их организации допускает возможность варьирования, т. е. пластичность этих структур.

Пластичность плазматической мембраны определяется возможностью варьирования ее структурных компонентов — использования разнообразных липидов и особенно белков. Существенную роль в функциональной и филогенетической пластичности плазматической мембраны играет и возможность изменений в широких пределах характера взаимоотношений между ее основными компонентами — липидами и белками. Пластичность опорно-сократимой системы периферической гиалоплазмы эукариотных клеток проявляется прежде всего в наличии нескольких форм структурной организации основных и вспомогательных сократительных белков, в определенной химической лабильности фибриллярных опорных структур, а также в сложных взаимодействиях между микротрубочковой и микрофибриллярной системой и системой промежуточных филаментов.

С другой стороны, при всем химическом и структурном многообразии надмембранных структур разных клеток им свойствен ряд общих принципиально важных признаков и в отношении морфофункциональной организации, и во взаимодействии с клеткой.

Таким образом, хотя в поверхностном аппарате эукариотных клеток и можно выделить три относительно «самостоятельные» субсистемы, в реализации разнообразных клеточных функций он выступает как единое целое. Это отчетливо проявляется в таких процессах, как, например, рецепция, транспорт в мембранной упаковке, образование межклеточных контактов. Так, и при кэпинге, и при эндоцитозе необходимо взаимодействие рецепторов плазматической мембраны («воспринимающая» часть которых входит в состав надмембранного аппарата) с компонентами субмембранной системы. Экзоцитоз секреторных гранул обеспечивается координированным функционированием механических систем субмембранного аппарата и белков плазматической мембраны. В образовании большинства разновидностей межклеточных контактов принимают в той или иной степени участие все три субсистемы поверхностного аппарата; существуют, однако, и такие типы контактов (щелевые соединения), в формировании которых роль двух субсистем (над- и



субмембранной) сведена к минимуму, что еще раз иллюстрирует структурную и функциональную пластичность поверхностного аппарата.

Единство и взаимозависимость его компонентов отчетливо выявляется также у прикрепляющихся к субстрату клеток при образовании фокальных контактов.

Одна из основных функций поверхностного аппарата — его участие в передаче внешних сигналов через цитоплазматические системы на ядерный аппарат клетки. В последние годы появились экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что в этих процессах важная роль принадлежит именно цитоскелету (как субмембранной, так и цитоплазматической его части), который таким образом как бы непосредственно участвует в регуляции активности генетического аппарата клетки; при этом специфичность передаваемой информации, по мнению некоторых исследователей, обеспечивается различной пространственной организацией цитоскелета. Однако механизмы этих процессов остаются совершенно невыясненными, и в этом направлении продолжаются интенсивные исследования.



## МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ АППАРАТ ЦИТОПЛАЗМЫ

### 3.1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Цитоплазма представляет собой рабочий аппарат клетки, в котором протекают основные метаболические процессы. Здесь сосредоточены общие и специальные органоиды. Специфическая дифференцировка клеток метазойных организмов и протистов чаще всего связана с гипертрофией одного либо нескольких органоидов или каких-то систем цитоплазмы.

В последние десятилетия достигнуты большие успехи в изучении отдельных органоидов и мембранных систем цитоплазмы. Понимание функционального значения этих образований возможно только через исследование их структурно-химической организации. В этом плане проведен детальный анализ основных органоидов белкового синтеза (рибосом) и систем, обеспечивающих энергетический обмен (митохондрий, хлоропластов, плазматических мембран прокариотных клеток). Большие успехи достигнуты и в изучении аппарата Гольджи. Открытие новых сортировочных органоидов существенно изменило наши представления о взаимодействии внутриклеточных мембранных органоидов с плазматической мембраной клетки и ее поверхностным аппаратом в целом.

По современным воззрениям метаболический аппарат цитоплазмы представляет собой систему, которая состоит из основной цитоплазмы (гиалоплазмы), немембранных органоидов, мембранных структур и их содержимого. Если раньше гиалоплазму считали однородной коллоидной системой, то теперь ясно, что это гетерогенная фаза цитоплазмы, способная к формированию сложных структур. Особая субсистема гиалоплазмы — цитозоль — формируется в области всех мембранных и немембранных структур цитоплазмы; морфобиохимическая организация и функции такого цитозоля в области разных органоидов неодинаковы.

В цитозолях органоидов осуществляются основные этапы ме-



таболических реакций, посредством которых клетка расщепляет одни малые молекулы и синтезирует другие, необходимые для ее функционирования и роста. Здесь же сосредоточены и запасные питательные вещества, главным образом в виде жировых капель и гранул гликогена. Имеется в основной цитоплазме и совершенная катаболическая система.

Таким образом, метаболический аппарат цитоплазмы достаточно дифференцирован и представлен специализированными структурами, выполняющими частные функции; тем не менее, он, находясь в тесной взаимосвязи и с поверхностным, и с ядерным аппаратами клетки, составляет с ними целостную систему.

### 3.2. ОРГАНИЗАЦИЯ РИБОСОМ

Рибосомы — сравнительно недавно открытые органоиды клетки. В цитоплазме клеток животных они были обнаружены в 50-е годы с помощью электронного микроскопа и назывались плотными частицами, гранулами Палада, малыми гранулярными частицами. Затем их удалось выделить биохимическими методами и показать наличие в них РНК. Тогда же было установлено, что рибосома имеет отношение к процессам синтеза белка в клетке. С тех пор проводятся детальные исследования морфофункциональной организации рибосом.

Рибосомы присутствуют и в прокариотных, и в эукариотных клетках. В клетках эукариот существуют две их разновидности: рибосомы собственно цитоплазмы и рибосомы, локализованные в таких органоидах, как митохондрии и хлоропласты. Константа седиментации\* рибосом прокариот 70 S, у более крупных рибосом цитоплазмы эукариотных клеток — 80 S. Рибосомы митохондрий в основном тоже относятся к классу 70 S, хотя в различных группах эукариот их константы седиментации значительно различаются: у грибов и эвгленовых — 70—74 S, у высших животных — 55—60 S, у высших растений — около 80 S. Рибосомы хлоропластов более однородны по этому признаку: их константа седиментации составляет 67—70 S.

Структурная организация рибосом всех названных групп принципиально одинакова (рис. 35, А). Рибосома состоит из двух субъединиц (или субчастиц): большой и малой. У 70 S рибосом (прокариоты) константы седиментации субъединиц соответственно 50 и 30 S, у 80 S рибосом — 60 и 40 S. В клетке существует динамическое равновесие между целыми и диссоциированными на субчастицы рибосомами ( $70\text{ S} \rightleftharpoons 50\text{ S} + 30\text{ S}$ ). Равновесие между рибосомами и их субчастицами можно сдвигать, изменяя содержание ионов  $\text{Mg}^{2+}$  в растворе: если снизить количество  $\text{Mg}^{2+}$ , то происходит диссоциация рибосом на суб-

\* Константа седиментации (S) характеризует скорость осаждения частиц в искусственном поле тяжести, которое создается при ультрацентрифугировании. По величине константы седиментации оценивают размеры частиц.



частицы. Кстати, стабильность 70 S и 80 S рибосом неодинакова: 70 S рибосомы начинают диссоциировать раньше, чем 80 S.

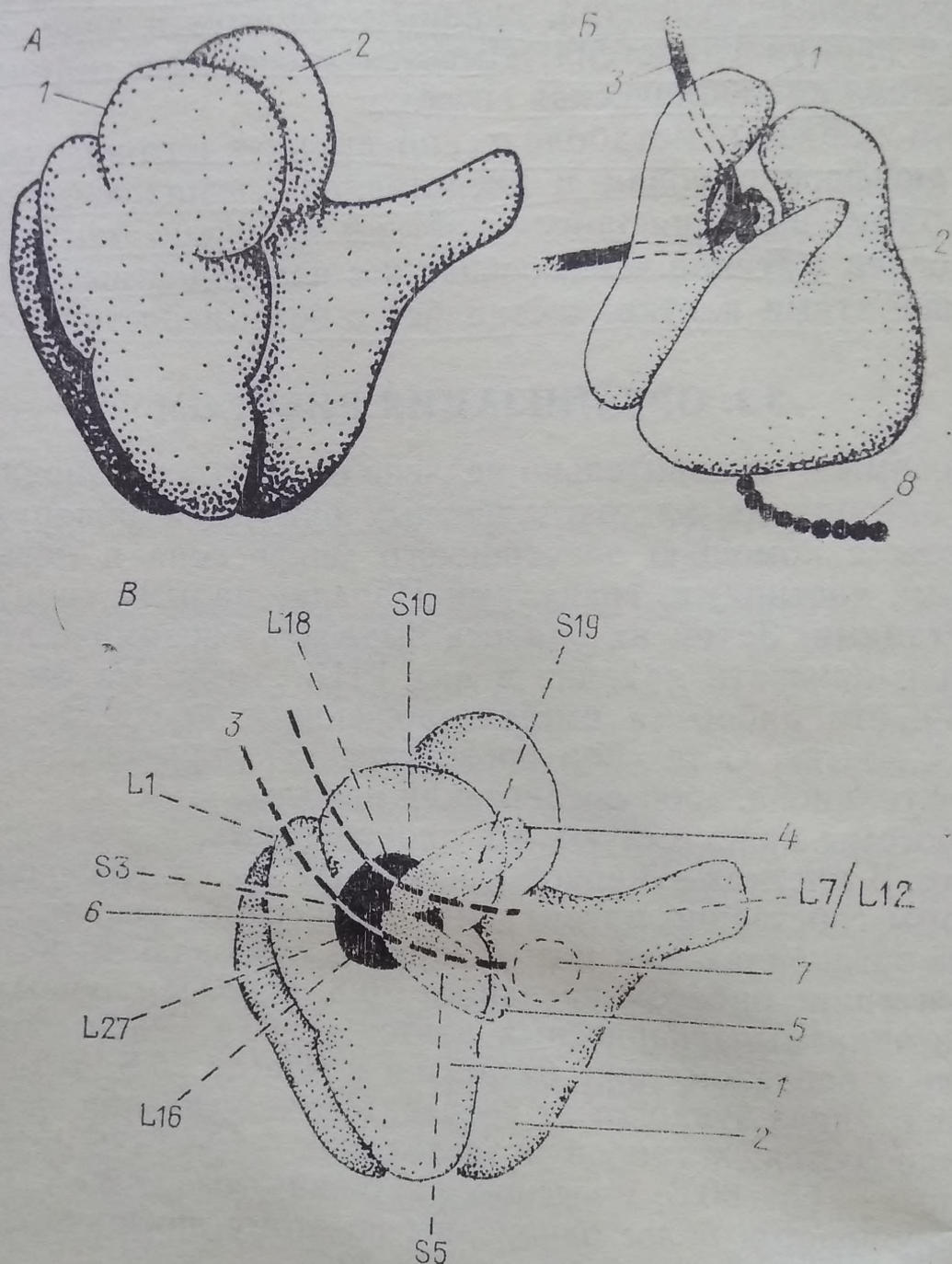


Рис. 35. Организация рибосом (по: Спирин, 1989).

А, Б — вид со стороны малой субчастицы (А) и сбоку (Б); В — локализация основных функциональных центров, иРНК и некоторых белков. 1 — малая и 2 — большая субчастицы рибосомы; 3 — иРНК; 4 — аминоксил-тРНК-связывающий центр (А-центр); 5 — пептидил-тРНК-связывающий центр (Р-центр); 6 — пептидилтрансферазный центр (Т-центр); 7 — центр связывания фактора элонгации; 8 — полипептид. S и L — белки соответственно малой и большой субчастиц.

В состав рибосом входят РНК и белки, упакованные в рибонуклеопротеид. При снижении концентрации ионов  $Mg^{2+}$  в растворе может происходить разворачивание рибонуклеопротеида и возникает более рыхлая структура, константа седиментации которой равна 35 S; затем вновь осуществляется скачкообразный переход — теперь в состояние 22 S, а далее наблюдается



плавное разворачивание тяжа вплоть до полного расправления нити РНП с константой седиментации 5 S.

В состав цитоплазматических рибосом эукариотных клеток входят четыре молекулы РНК с константами седиментации 28 S (26 S), 18 S, 5,8 S и 5 S. Что касается рибосом митохондрий и хлоропластов, то их высокомолекулярные РНК близки по константе седиментации к таковым прокариот (23 S и 16 S). В большинстве митохондриальных рибосом 5 S РНК не обнаружена; исключения составляют митохондриальные рибосомы высших растений. В рибосомах хлоропластов присутствует низкомолекулярная 4,5 S РНК. 5,8 S РНК эукариот является гомологом 5'-концевой части 23 S РНК прокариот, а 4,5 S РНК хлоропластов — 3'-концевой части. Предполагают, что эти низкомолекулярные РНК образуются в результате расщепления предшественника высокомолекулярной РНК во время процессинга (или созревания рРНК). В большой субъединице рибосом у эукариот содержатся 28 S (26 S), 5,8 S и 5 S РНК; у прокариот — 23 S и 5 S РНК; в малой — соответственно 18 S (эукариоты) и 16 S (прокариоты). Высокомолекулярная рРНК малой субчастицы содержит около 1500—1600 (16 S) и 1800 (18 S) нуклеотидных остатков, в рРНК большой субчастицы их около 3000 (23 S) и 3400—5000 (26 S—28 S). Длина 5 S рРНК составляет около 120 нуклеотидных остатков.

К настоящему времени установлена первичная структура рРНК многих объектов; гомология по этому признаку является одним из критериев эволюционного родства, что широко используется в сравнительных исследованиях.

Рибосомные РНК имеют характерную вторичную структуру, которая создается за счет коротких двуспиральных участков с преобладанием «шпилек» (участки молекулы, образованные комплементарно связанными нуклеотидами, как и в молекуле ДНК). Около 2/3 нуклеотидов РНК организовано в такие спирали, остальная часть молекулы представлена одотяжевыми «аморфными» участками, где сосредоточены пуриновые основания.

Белковый состав рибосом гетерогенен. Молекулярные массы белков варьируют от 10 до 30—70 кДа. Число белковых молекул в рибосомах эукариот составляет около 70, прокариот — около 50.

Идентификацию рибосомных белков проводят с помощью их разделения при двумерном электрофорезе. Обозначаются рибосомные белки цифрами по порядку их расположения на электрофореграммах: белки малой (small) субъединицы обозначаются как S1, S2 и т. д., белки большой (large) субъединицы — L1, L2 и т. д. Почти каждый белок рибосомы уникален, т. е. представлен одной молекулой на рибосому. Большая часть рибосомных белков относится к основным, однако в рибосоме со-



держится и небольшое количество нейтральных и кислых белков.

Одним из основных объектов исследования структурно-функциональной организации рибосом была *Escherichia coli*. Оказалось, что в состав малой субъединицы рибосом *E. coli* входит 21 белок, в состав большой — 32. Определена также первичная структура рибосомных белков *E. coli*; почти все их аминокислотные последовательности уникальны. Исключение составляют белок S20, идентичный белку L26, и белки L7 и L12, которые по сути являются одним и тем же белком (L7 — это ацетилированный по N-концу L12). L7/L12 *E. coli* — кислый белок, представленный четырьмя молекулами на рибосому. И у про-, и у эукариот в рибосомах имеются белки, аналогичные L7/L12.

Рибосомные белки эволюционно весьма консервативны; гомология по аминокислотным последовательностям у филогенетически отдаленных групп может достигать 40—50%.

В составе рибосомы ее белки имеют в основном глобулярную конформацию, которую могут сохранять и при выделении. Белок L7/L12, образующий в растворе димер, представляет собой палочкообразную молекулу; мономеры имеют глобулярный C-концевой домен и вытянутый N-концевой.

Важное значение для понимания работы рибосомы имеет выяснение характера взаимодействия ее компонентов. Некоторые белки рибосом связаны между собой в достаточно стабильные комплексы; 5 S РНК взаимодействует с определенными белками большой субчастицы, образуя нуклеопротеидный комплекс, способный связывать тРНК. Интересно отметить, что наборы белков, образующих комплексы с 5 S РНК, сходны у про- и эукариот. Ряд рибосомных белков специфически и независимо от других белков связываются с определенными участками высокомолекулярных РНК, это так называемые «коровые» белки. Наличие одного или нескольких «коровых» белков необходимо для связывания с РНК других рибосомных белков. Все эти взаимодействия играют важную роль в формировании функциональных (активных) центров рибосом, образующихся при укладке тяжа РНП в субъединицы (рис. 35, Б). Так, в рибосоме находятся иРНК-связывающий участок; участок для удерживания аминоксил-тРНК (А-центр); пептидил-тРНК-связывающий участок (Р-центр), а также пептидил-трансферазный центр, в котором происходит образование пептидных связей (Т-центр).

Уже к концу первого десятилетия исследования рибосом был охарактеризован их рабочий цикл. Основные этапы синтеза белка можно представить следующим образом (подробно эти вопросы излагаются в специальных курсах биохимии и молекулярной биологии). Процесс белкового синтеза подразделяется на три этапа: инициацию (начало синтеза), элонгацию (образование пептидной цепочки) и терминацию (окончание синтеза). Детали биосинтеза белка хорошо изучены у прокариот; приве-



денные ниже сведения касаются именно этих организмов (рис. 36).

При инициации синтеза белка происходит сборка рибосомы из субчастиц и присоединение к ней иРНК и формилметионил-тРНК. На этом этапе требуется участие вне ribосомных белковых факторов IF-1, IF-2, IF-3 и ГТФ. После сборки готового к синтезу белка комплекса происходит высвобождение белковых факторов, для чего необходимо расщепление ГТФ на ГДФ и неорганический фосфат. В рибосоме иРНК располагается между большой и малой субчастицами; формилметионил-тРНК, связанная с иницирующим кодоном иРНК, занимает Р-центр.

Стадия элонгации начинается с присоединения к рибосоме аминоацил-тРНК в А-центре, что требует участия вне ribосомных белковых факторов EF-Tu, EF-Ts и ГТФ. Затем образуется пептидная связь между карбоксильной группой формилметионильного остатка и аминок группой аминоацильного остатка, находящегося в А-центре. Этот процесс получил название транс-пептидации, т. е. переноса пептидильного остатка (в первом цикле элонгации эту роль выполняет формилметионин) на аа-тРНК, локализованную в А-центре. Затем наступает стадия транслокации — перемещение рибосомы вдоль иРНК на один кодон, в результате чего пептидил-тРНК из А-центра попадает в Р-центр, а освободившаяся тРНК в Р-центре уходит из рибосомы. В этом процессе участвуют вне ribосомный фактор EF-G в комплексе с молекулой ГТФ. После стадии транслокации происходит гидролиз ГТФ с образованием ГДФ и неорганического фосфата и высвобождение фактора. В освободившийся А-центр садится новая молекула аа-тРНК; выбор аа-тРНК осуществляется кодоном, который в этот момент находится в непосредственной близости от А-центра. Стадия элонгации заканчивается, когда на малой субчастице рибосомы оказывается один из терминирующих кодонов иРНК.

Последняя стадия синтеза белка — терминация — происходит с участием вне ribосомных факторов — RF-1 или RF-2, а также RF-3, связывающего ГТФ; присоединение этих факторов вызывает отщепление готового полипептида от последней пептидил-тРНК. Освобождение рибосом от факторов терминации и иРНК и диссоциация рибосом на субъединицы требует участия дополнительных белковых факторов и ГТФ.

Таким образом, первый этап изучения рибосом ознаменован установлением принципов их структурной организации и созданием схемы их работы в процессе синтеза белка. Задачей дальнейших исследований структурно-химической организации и функционирования рибосом стало уточнение морфологии субчастиц и выяснение конкретной роли каждого компонента в сложном и многоэтапном процессе белкового синтеза.

Вначале считалось, что обе субчастицы рибосом имеют округлую форму. Применение тонких электронно-микроскопиче-



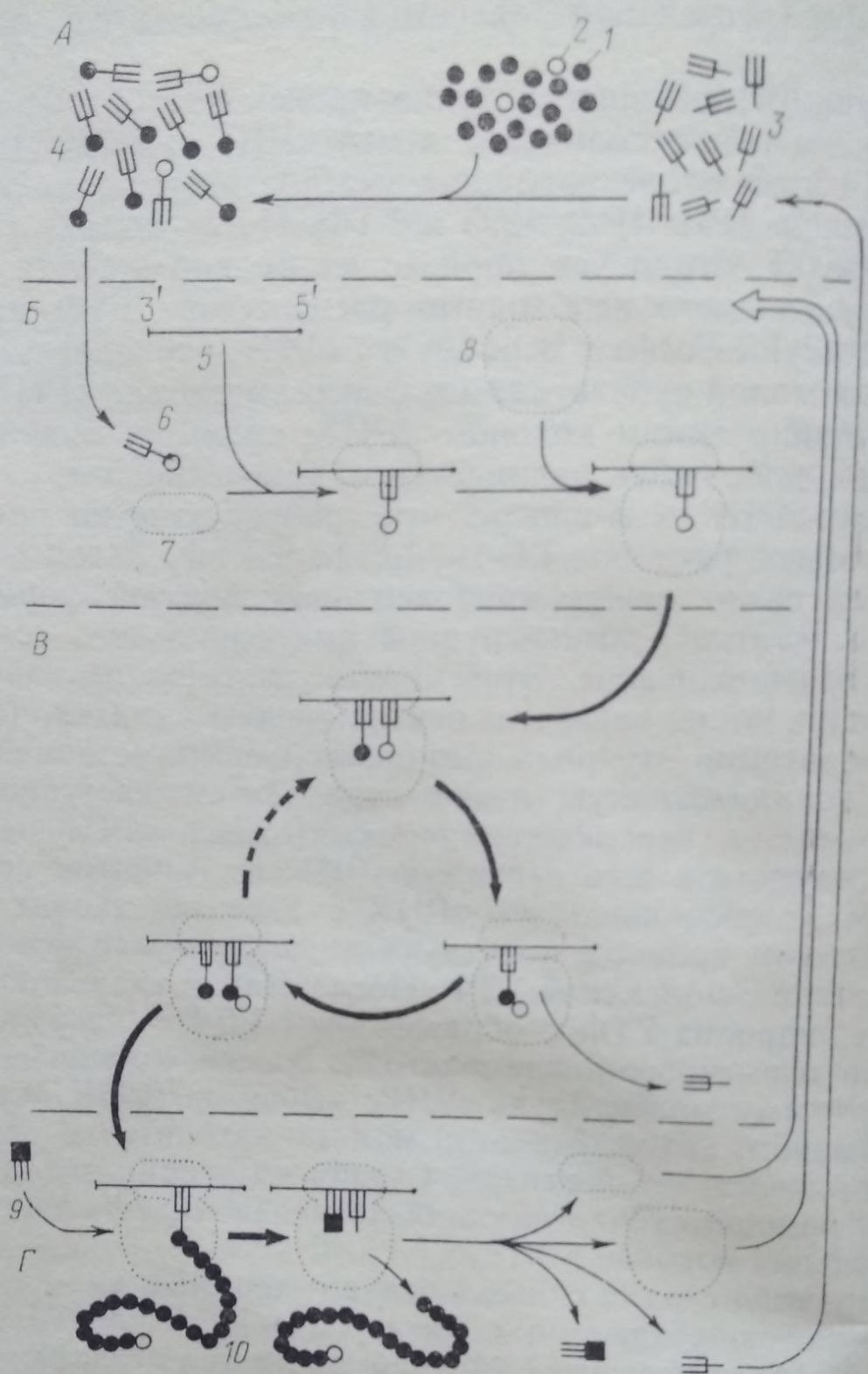


Рис. 36. Цикл работы рибосомы прокариот.

А — синтез аа-тРНК; Б—Г — стадии инициации (Б), элонгации (В) и термации (Г).  
 1 — аминокислоты; 2 — формилметионин; 3 — тРНК; 4 — аа-тРНК; 5 — иРНК; 6 — формилметионил-тРНК; 7 — 30 S и 8 — 50 S субчастицы рибосомы; 9 — фактор термации; 10 — синтезированный полипептид.

ских методов позволило установить, что 30 S субчастица прокариот имеет продолговатую форму (рис. 35, А, Б) и подразделяется на головку, тело и платформу (или боковой выступ); 40 S субчастица эукариот (рис. 37, В) имеет дополнительные детали — «клюв» (выступ головки) и эукариотические лопасти (конец тела, противоположный головке, раздвоен). Большие субчастицы рибосом про- и эукариот очень похожи по форме



(рис. 37, А, В). Они имеют по три выступа или протуберанца — центральный (головка), боковой палочкообразный выступ (L7/L12 стержень) и боковую долю (L1 ребро). Две субчастицы объединяются в рибосому «головкой к головке» (рис. 35, Б).

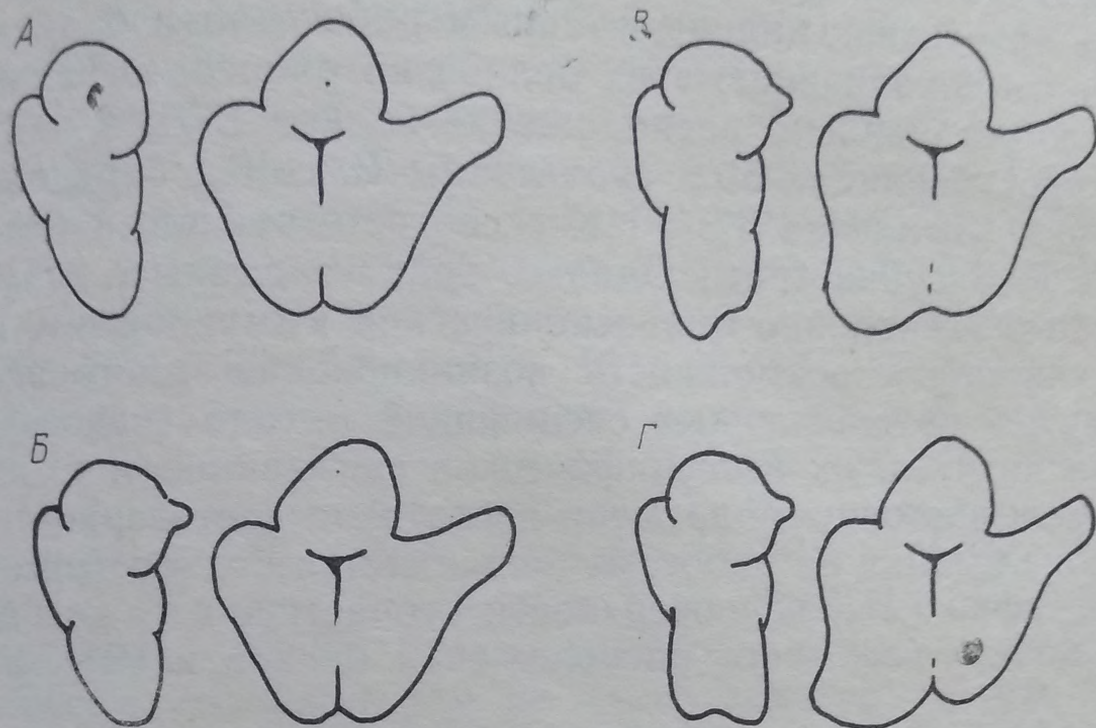


Рис. 37. Структура малых и больших субчастиц рибосом эубактерий (А), архебактерий (Б), эукариот (В) и эоцитов (Г) (по: Lake e. a., 1982).

Структура малых и больших субчастиц рибосом архебактерий имеет уникальные черты, отличающие их от рибосом как прокариот, так и эукариот (рис. 37, Б). Интересно отметить, что на этом основании некоторые авторы выделяют из архебактерий еще одно, четвертое царство организмов — эоциты (рис. 37, Г).

Для выяснения структурно-функциональной организации рибосом необходимо определить локализацию в рибосоме РНК и индивидуальных белков. Изолированная в компактной форме 16 S РНК представляет собой У-образную структуру с ветвями неравной длины; по размерам и контурам она похожа на 30 S субчастицу; 23 S РНК напоминает 50 S субчастицу со сглаженными контурами. Цепь рРНК, обладая способностью к самоукладыванию, образует компактный каркас, определяя тем самым форму и размеры субъединиц рибосом. Белки располагаются преимущественно на поверхности компактно уложенной рРНК.

Локализация индивидуальных белков в рибосоме определяется различными методами. Один из них — метод поперечных срезов — обработка рибосом химическими веществами (би-функциональными реагентами с известной длиной молекулы), сшивающими друг с другом белки, расположенные в рибосоме по соседству. Использование ряда агентов с разной длиной молекул и последующая идентификация белков дает возможность определить, какие конкретно белки являются соседями на ри-



босоме и каково расстояние между ними. Ответ на эти вопросы можно получить и с помощью различных физических методов, в том числе и нейтронного рассеяния; однако результаты невозможно соотнести с морфологией рибосом. Такую возможность предоставляет электронно-микроскопическая иммунохимия. Используя антитела к индивидуальным рибосомным белкам, можно выявить локализацию этих белков на рибосоме. Таким образом было установлено расположение белков L7/L12 и L1 в боковых протуберанцах 50 S субчастицы *E. coli* и определена локализация комплекса 5 S РНК с соответствующими белками в головке 50 S субчастицы. Однако, трактуя данные, полученные с помощью электронно-микроскопической иммунохимии, необходимо учитывать возможность возникновения многочисленных артефактов, обусловленных спецификой метода (недостаточная очистка антител, их неспецифическое связывание и т. д.). Тем не менее к настоящему времени достаточно достоверно установлена локализация на рибосоме большинства белков (рис. 35, В) и топография РНК на поверхности субчастиц, а также предложены модели взаимного расположения белков и РНК в рибосоме.

При исследовании роли каждого белка в работе рибосомы используются самые разные методы — и выделение индивидуальных белков, и блокировка определенных звеньев белкового синтеза с помощью ингибиторов, и многие другие. Так, с помощью специальной обработки удаляют из рибосом те или иные группы белков, а затем определяют, сохранилась ли у таких рибосом какая-либо функция, связанная с процессом белкового синтеза (скажем, пептидилтрансферазная активность). Если к «неактивным» рибосомам добавить одну из выделенных групп белков, то у них вновь может появиться соответствующая функциональная активность. Затем группу выделенных белков разделяют на индивидуальные и каждый белок добавляют по очереди к неактивным рибосомам; если в каком-то случае функциональная активность восстанавливается, то ясно, каким белком она определяется.

Однако такого рода исследования затруднены тем, что между отдельными белками, составляющими активные центры рибосом, существуют кооперативные взаимодействия. Утрата функциональной активности при отщеплении данной белковой молекулы может быть обусловлена не прямым ее участием в исследуемой функции, а лишь результатом нарушения сложных кооперативных взаимодействий между молекулами. В связи с этим большой интерес представляет изучение естественных генетических мутаций по отдельным рибосомным белкам, при которых нарушения в белковом составе могут быть компенсированы благодаря перестройкам на надмолекулярном уровне организации.

Одним из весьма перспективных направлений исследований является сравнительный анализ структурно-химической органи-



зации различных разновидностей рибосом с помощью молекулярно-биологических методов. В частности, удалось установить, что, несмотря на сходство выполняемой главной функции (общность процессов белкового синтеза), рибосомы из разных источников значительно отличаются друг от друга. Так, например, сравнение количества белков в рибосомах показало, что митохондриальные рибосомы превосходят в этом отношении и рибосомы прокариот, и цитоплазматические рибосомы.

В частности, как уже говорилось, в большую субъединицу рибосомы *E. coli* входят 32 белка, в малую — 21; в большой субчастице рибосомы цитоплазмы *Xenopus laevis* имеется 37 белков, в малой — 34; митохондриальные же рибосомы *X. laevis* содержат соответственно 44 и 40 белков. Как видно, малые субъединицы рибосом митохондрий ксенопуса и *E. coli* отличаются на 19 белков, хотя обе имеют близкие константы седиментации. Митохондриальные рибосомы грибов и млекопитающих различаются между собой; рибосомы грибов (75 S) содержат относительно больше белка, чем у прокариот; митохондриальные рибосомы млекопитающих (55 S), будучи значительно мельче прокариотных рибосом, содержат тем не менее довольно много белков, абсолютное содержание РНК на рибосому в них меньше, чем у прокариот. Значительные различия существуют также не только в количественном, но и в качественном составе рибосомных белков. Причем они наблюдаются не только между рибосомами прокариот, цитоплазмы эукариот и митохондрий, но и между митохондриальными рибосомами из разных источников. Различия есть даже между близкородственными видами. Например, три белка большой субъединицы митохондриальных рибосом *X. laevis* не обнаружены у *X. mulleri*, а четыре белка, характерные для *X. mulleri*, отсутствуют у *X. laevis*.

У галофильной бактерии *Halobacterium cutirubrum*, рибосомы которой стабильны лишь в растворах, содержащих соли в больших концентрациях, все рибосомные белки кислые, а не основные, как у других изученных групп.

Интересной особенностью белков рибосом является удивительная консервативность в эволюции белков L7/L12, аминокислотная последовательность которых идентична даже у филогенетически отдаленных групп.

Значительные различия между рибосомами устанавливаются и при сопоставлении их РНК. Рибосомные РНК митохондрий не гомологичны ни цитоплазматическим рРНК, ни РНК рибосом прокариот. Они различаются и первичной, и вторичной структурой. Вторичная структура РНК митохондриальных рибосом менее стабильна, чем у прокариот и цитоплазматических рибосом эукариот. В РНК митохондриальных рибосом значительно меньше спиральных участков («шпилек»), структура, образованная ею, менее компактна. Надо отметить, что тРНК митохондрий тоже присущи своеобразные черты: они отличаются



ся от цитоплазматических тРНК и мРНК прокариот последовательностью оснований, содержанием Г—Ц-пар, характером посттранскрипционных изменений, вторичной структурой (она так же, как и у рРНК митохондрий, менее стабильна, чем у РНК рибосом прокариот и цитоплазмы) и, наконец, содержанием «минорных» оснований; мРНК митохондрий включает большое количество полиадениловых остатков, что характерно для мРНК эукариот, но не прокариот.

Рибосомы митохондрий и прокариот чувствительны к одним и тем же антибиотикам, блокирующим синтез белка; эти антибиотики не действуют на цитоплазматические рибосомы. К их числу относятся хлорамфеникол, эритромицин. Некоторые ингибиторы синтетических процессов в цитоплазме (например, циклогексимид) не затрагивают митохондриального синтеза. Таким образом, ясно, что белоксинтезирующий аппарат митохондрий, будучи в значительной степени уникальным, имеет много сходного с белоксинтезирующим аппаратом и прокариот, и цитоплазмы.

Чрезвычайно интересные данные получены при создании так называемых «гибридных» рибосом из субъединиц разного происхождения. Комбинируя субъединицы, исследуют способность «гибридных» рибосом к синтезу белка. Оказалось, что субъединицы цитоплазматических рибосом эукариот вполне взаимозаменяемы; активные «гибриды» формируются также из субъединиц рибосом *E. coli* и хлоропластов шпината или эвглены. Некоторые белки большой субъединицы рибосом *E. coli* могут даже заменять соответствующие белки рибосом дрожжей и клеток печени крысы, полностью сохраняя при этом функциональную активность. Такие же данные получены для малой субъединицы рибосом *E. coli*, где каждый белок может быть заменен гомологичным белком из 30 S субъединицы рибосом бактерий разных видов *Bacillus*, и активный синтез белка все равно будет происходить. Если же субъединицы рибосом *E. coli* или хлоропластов шпината соединить с субъединицами митохондриальных рибосом дрожжей, то эти гибриды не активны.

Таким образом, накопленный к настоящему времени обширный, хотя и достаточно фрагментарный, сравнительный материал по структурно-химической организации рибосом и белоксинтезирующих систем как в одних и тех же клетках (митохондриальные, цитоплазматические и пластидные белоксинтезирующие системы), так и в клетках организмов разного филогенетического уровня (прокариоты, низшие и высшие эукариоты) показывает, что все белоксинтезирующие системы и основные молекулярные «машины» этих систем — рибосомы — построены по сходным принципам.

Вместе с тем имеются и многочисленные факты, показывающие, что в организации белоксинтезирующих систем существует большое количество модификаций (как в пределах одной



клетки, так и между разными клетками). Не выходя за рамки общих закономерностей организации белоксинтезирующих систем, эти модификации не нарушают их основных функций. Естественно, что целенаправленное изучение таких модификаций представляет большой интерес для дискретного анализа организации белоксинтезирующих структур.

В то же время анализ этих модификаций и, в первую очередь, особенностей организации рибосом митохондрий и хлоропластов по сравнению с рибосомами прокариот и цитоплазмы эукариот позволит разобраться в том, каким образом произошло подчинение этих белоксинтезирующих систем общим интегративным механизмам клеток. Весьма возможно, например, что обилие белков в митохондриальных рибосомах по сравнению с рибосомами прокариотных клеток обусловлено работой миторибосом в таких сложных клеточных системах, как эукариотные клетки.

### 3.3. ОРГАНОИДЫ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА

#### 3.3.1. МИТОХОНДРИИ

История исследования митохондрий насчитывает около 130 лет — со времени описания их в 1850 г. Р. Келликером, который обнаружил их в мышцах насекомых и назвал саркосомами (данный термин до сих пор применяется для обозначения митохондрий мышечной ткани).

Называть митохондриями эти органоиды стали в 1898 г. Однако планомерное их изучение биохимиками и цитологами началось лишь в 40—50-х годах нашего столетия, когда методами дифференциального центрифугирования удалось получить чистые фракции митохондрий и показать, что в них локализуются ферменты дыхательной цепи, цикла Кребса и окислительного фосфорилирования; в 1952—53 гг. были проведены исследования ультраструктуры митохондрий. К настоящему времени накоплены многочисленные сведения о морфофункциональной организации этих органоидов.

Митохондрии отсутствуют у прокариот (бактерий, синезеленых водорослей) и встречаются практически во всех клетках эукариот, за исключением некоторых паразитических протистов (*Entamoeba histolytica*, *Trychomonas*) и свободноживущей *Reomonaxa polustris*, обитающей в условиях дефицита кислорода. Количество митохондрий в клетке значительно варьирует: у *Trypanosoma* — от 20 до 72, в соматических клетках млекопитающих, как правило, 500—1000 митохондрий, а у гигантской амёбы *Chaos chaos* их число достигает 500 000.



Однако объемные реконструкции митохондрий по сериям срезов, полученные для многих объектов с помощью электронно-микроскопических исследований, показали, что количество митохондрий в клетках, по-видимому, значительно меньше, чем предполагалось раньше.

Так, у дрожжей, грибов, в гаметам хламидомонад имеется одна гигантская, сильно разветвленная митохондрия. Естественно, что на обычных срезах при этом выявляются как бы многочисленные мелкие митохондрии (рис. 38). В фибробlastах и нервных клетках мозга, культивируемых *in vitro*, при реконструкции обнаруживаются длинные нитевидные митохондрии, а в лимфоцитах — две-три крупные митохондрии, расположенные вокруг ядра. В поперечно-полосатых мышечных волокнах небольшое количество сильно разветвленных гигантских митохондрий образует так называемую митохондриальную сеть.

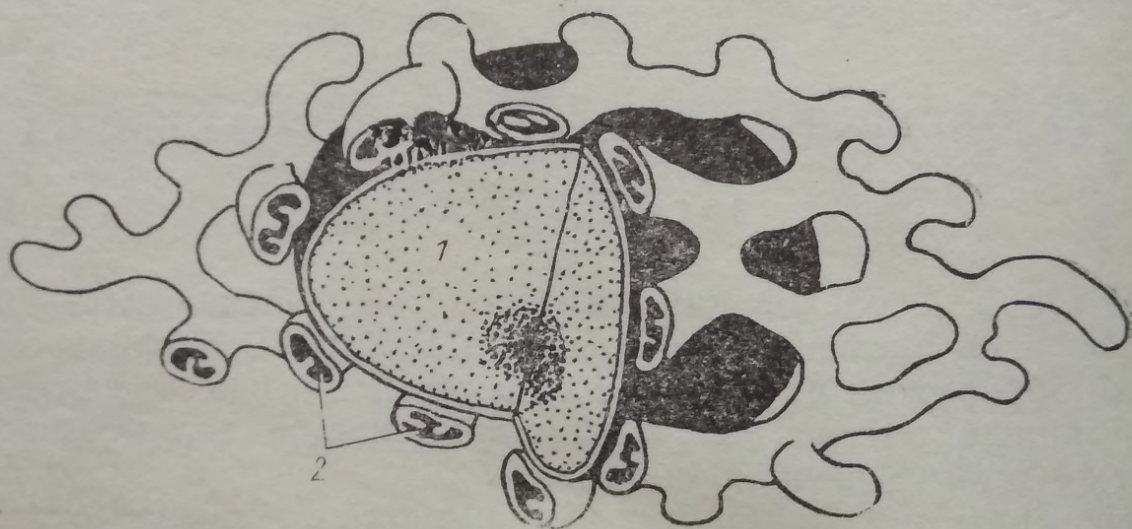


Рис. 38. Гигантская митохондрия гриба.

1 — ядро, 2 — участки гигантской митохондрии на поперечном срезе.

Пластичность организации митохондрий проявляется в их изменениях в онтогенезе. Например, вначале в зооспоре одного из оомицетов всего одна крупная митохондрия. По мере развития она утоньчается, в ней появляются сквозные отверстия и в конечном итоге образуются четыре митохондрии: одна крупная и три мелкие. У отдельных представителей иглокожих большая часть мелких митохондрий в ооцитах по мере роста этих клеток сливаются, и возникает гигантская кольцевидная митохондрия, окружающая обычные мелкие митохондрии и некоторые другие органоиды (в частности, аппарат Гольджи). После попадания ооцитов в морскую воду происходит ветвление, а затем и фрагментация гигантской кольцевидной митохондрии на многочисленные мелкие. Одновременно с этим наблюдается активизация дыхания ооцита. Подобные изменения отмечаются в ходе клеточного цикла у *Euglena gracilis*. Мелкие митохондрии объединяются в гигантскую, которая затем фраг-



ментируется. И в этом случае активизация дыхания совпадает с образованием многочисленных мелких митохондрий из одной гигантской.

Размеры и форма митохондрий, выявляемых на обычных ультрамикроскопических срезах, сильно варьируют. По форме они бывают нитевидными, палочковидными, округлыми и гантелеобразными даже в пределах одной клетки. Кроме того, фазово-контрастная микроскопия живых клеток показала, что митохондрии — очень динамичные структуры: они могут расти в длину, сжиматься, ветвиться, делиться — и все это быстрее, чем за одну минуту.

Митохондрии располагаются в клетке, как правило, или в тех участках, где расходуется энергия, или около скоплений субстрата (например, липидных капель). Строгая ориентация митохондрий обнаруживается вдоль жгутика у сперматозоидов; в эпителиальных клетках почечных канальцев митохондрии локализируются в складках базальной мембраны, образуя вместе с нею аппарат активного транспорта ионов, свойственный выделительным и осморегулирующим эпителиям. Скопление митохондрий обнаруживается в области синапсов и в фоторецепторных клетках у основания наружного членика, где они составляют особую структуру — миоид. Естественно, что такое расположение митохондрий уменьшает потери АТФ во время ее диффузии.

Как показано на большом сравнительно-цитологическом материале, общий план строения митохондрий один и тот же у всех эукариот. Митохондрии всех организмов от дрожжей до высших животных окружены двумя мембранами, между которыми располагается межмембранное пространство. Внутренняя мембрана образует выросты в митохондриальный матрикс — кристы; в матриксе содержатся ДНК, рибосомы и различные включения. Рибосомы иногда прикрепляются к внутренней мембране или образуют полисомные цепочки (рис. 39).

Форма крист может быть пластинчатой или трубчатой, они располагаются либо параллельно длинной оси митохондрии (аксоны нервных клеток, поперечно-полосатые мышцы), либо перпендикулярно ей (клетки печени, почек). Кристы митохондрий весьма лабильные образования и легко переходят из одной формы в другую, а иногда могут и редуцироваться. Например, при анаэробном развитии дрожжей кристы почти исчезают; если вновь создать аэробные условия, то кристы восстанавливаются.

Структура митохондрий зависит от функциональной активности ткани и организма. При этом может изменяться не только форма и количество митохондриальных крист, но и количество самих митохондрий. В функционально аналогичных структурах у филогенетически отдаленных животных митохондрии схожи между собой больше, чем в разных органах одного и



того же вида. Например, в структуре митохондрий летательных мышц голубя и стрекозы больше сходства, чем между митохондриями летательных и скелетных мышц стрекозы.

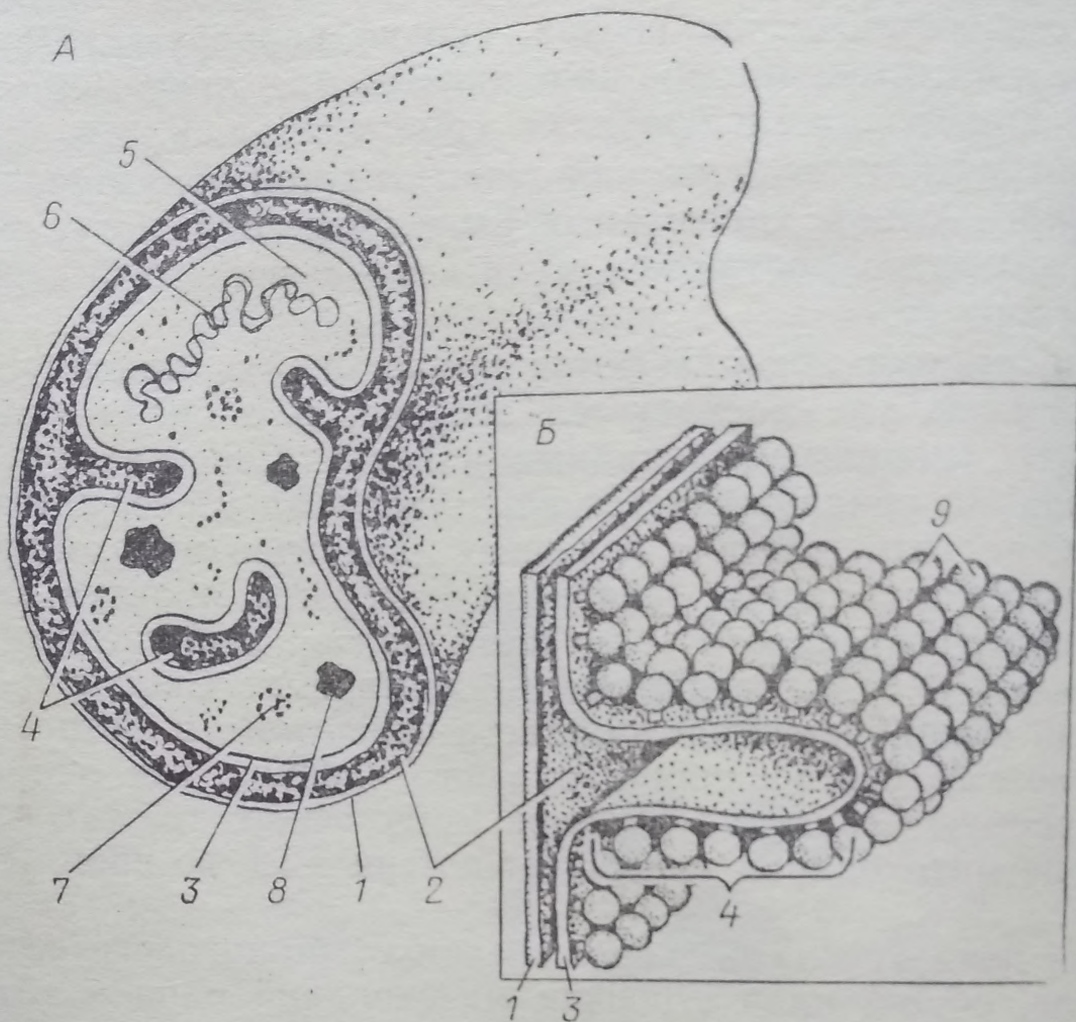


Рис. 39. Общая схема организации митохондрии А)) и участок кристы с грибовидными телами (Б).

1 — наружная мембрана, 2 — межмембранное пространство, 3 — внутренняя мембрана, 4 — кристы, 5 — митохондриальный матрикс, 6 — ДНК, 7 — рибосомы, 8 — конкреции фосфата кальция, 9 — грибовидные тела.

Количество и степень развития крист определяются функциональной активностью ткани. Так, в митохондриях спорозист *Fasciola hepatica*, паразита печени моллюсков, кристы единичны. У церкарии, ведущей активный свободный образ жизни, число крист очень велико. Митохондрии большинства растительных клеток обычно имеют мало крист, но в секреторных клетках растений их так же много, как и в животных клетках.

Будучи лабильной структурой, митохондрии легко поддаются адаптивным перестройкам. Так, при гиподинамии у крыс количество как крист в митохондриях, так и самих митохондрий этих животных резко уменьшается. Если же заставить активно двигаться (например, плавать), митохондрии столь же быстро принимают прежний вид, и восстанавливается их исходное количество.

Наружная и внутренняя мембраны митохондрий значительно различаются между собой. При повышении или понижении



осмотического давления внутренняя мембрана соответственно сморщивается или расправляется, легко переходя из одного состояния в другое; наружная мембрана способна лишь к необратимому растяжению, ведущему к разрыву. Удаляя таким образом наружную мембрану, получают препараты изолированной внутренней мембраны митохондрий. Отличаются мембраны и проницаемостью: наружная мембрана характеризуется неспецифической проницаемостью, а проницаемость внутренней, напротив, высокоспецифична. Мембраны митохондрий неодинаковы и по устойчивости к различным ферментам и детергентам.

Различия в свойствах митохондриальных мембран обусловлены значительными различиями в их структуре. Так, соотношение липидов и белков в наружной мембране составляет 0,88 (т. е. в ее состав входит меньше 20% белка), а во внутренней — 0,30 (75% белка). Липиды внутренней и внешней мембран различаются по содержанию насыщенных жирных кислот — в липидах внутренней мембраны их больше. Неодинаков и состав липидов в мембранах. Так, во внутренней мембране очень низок уровень содержания холестерина и высок — кардиолипина, «двойного» фосфоглицерида, состоящего из двух остатков фосфатидной кислоты, связанных друг с другом глицерином. Этот липид практически не встречается в других мембранах эукариотных клеток и, по-видимому, обуславливает малую проницаемость внутренней митохондриальной мембраны для ионов.

Неспецифическая проницаемость наружной мембраны определяется наличием в ней белков поринов, формирующих в липидном бислое многочисленные каналы, через которые могут проходить молекулы массой до 10 кДа (своеобразное молекулярное сито, напоминающее наружную мембрану грациликутных бактерий).

Наружная мембрана митохондрий бедна ферментами; много их и в межмембранном пространстве. Зато внутренняя мембрана и митохондриальный матрикс буквально насыщены ими. Так, в матриксе сосредоточены ферменты цикла Кребса и окисления жирных кислот. Во внутренней мембране локализованы цепь переноса электронов, дыхательная цепь, ферменты фосфорилирования и многочисленные транспортные системы, обеспечивающие ее избирательную проницаемость.

Порядок расположения переносчиков электронов был определен с помощью различных ингибиторов, блокирующих различные звенья дыхательной цепи: электроны от субстрата передаются флавопротеиновыми дегидрогеназами через убихинон цитохромному комплексу ( $b-c_1$ ), а от него с помощью цитохрома  $c$  — цитохромоксидазе (цитохромы  $a-a_3$ ) и, наконец, на кислород. Таким образом, переносчики электронов располагаются в соответствии с окислительно-восстановительным потен-



циалом, который наиболее высок у кислорода. По мере перехода электронов с высокого энергетического уровня на низкий энергия окисления трансформируется в энергию макроэргов.

При выделении переносчиков в чистом виде оказалось, что жирорастворимый кофермент Q (убихинон) и цитохром с отделяются легко; остальные переносчики очень прочно связаны с мембраной и представляют собой сложные молекулярные комплексы. Уже давно выделены четыре дыхательных комплекса: НАДН-дегидрогеназный комплекс (НАДН-КоQ-редуктаза), сукцинатдегидрогеназный комплекс (сукцинат-КоQ-редуктаза), комплекс цитохромов  $b-c_1$  (КоQ- $H_2$ -цитохром c-редуктаза) и цитохромоксидаза (цитохромы  $a-a_3$ ).

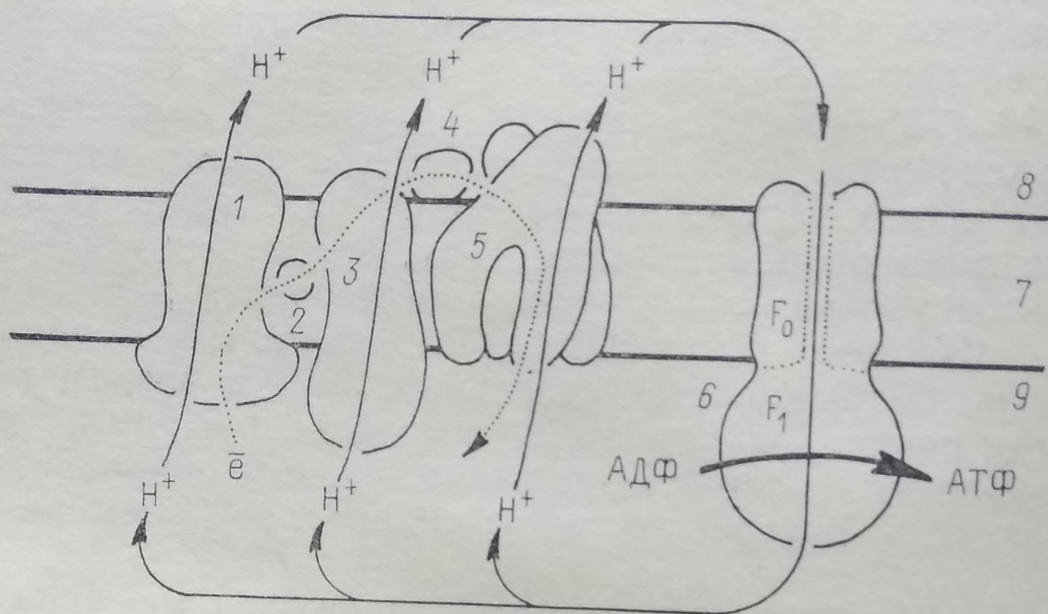


Рис. 40. Система окислительного фосфорилирования в мембране митохондрии.

1—5 — компоненты дыхательной цепи: 1 — НАДН-дегидрогеназный комплекс, 2 — убихинон, 3 — комплекс цитохромов  $b-c_1$ , 4 — цитохром c, 5 — цитохромоксидазный комплекс, 6 — АТФ-синтазный комплекс, 7 — внутренняя мембрана митохондрии, 8 — межмембранное пространство, 9 — матрикс.

Примерно в это же время с помощью электронно-микроскопического метода негативного контрастирования были обнаружены на обращенной в матрикс поверхности внутренней мембраны митохондрий структуры, названные грибовидными тельцами. Оказалось, что головки грибовидных телец связаны с фосфорилированием: если удалить головки и затем реконструировать дыхательную цепь, то перенос электронов идет, а фосфорилирования не происходит. В дальнейшем обнаружилось, что головки содержат фермент, обладающий АТФазной активностью, так называемый  $F_1$ -фактор, или фактор Рэкера. Если донавливается ее способность к окислительному фосфорилированию.

К настоящему времени накоплены многочисленные данные об организации компонентов, обеспечивающих процессы окислительного фосфорилирования (рис. 40). Так, Ко-Q-цитохром



с-редуктаза, или комплекс цитохромов  $b-c_1$ , передающий электроны от убихинона на цитохром  $c$ , имеет молекулярную массу около 250 кДа и состоит из 10—11 полипептидных субъединиц, в числе которых цитохром  $b$ , цитохром  $c_1$  и белки, содержащие FeS.

Высокая степень гомологии по аминокислотным последовательностям характерна для цитохромов  $b$  митохондрий таких филогенетически отдаленных форм, как человек, мышь, бык, дрожжи, *Aspergillus* и цитохрома  $b_6$  хлоропластов шпината.

Комплекс  $b-c_1$  представляет собой димер, где мономеры ориентированы перпендикулярно плоскости мембраны и расположены таким образом, что большая часть молекулы (около 7 нм) выступает из мембраны в матрикс, а меньшая (около 3 нм) — в межмембранное пространство. Размер молекулы составляет около 15 нм.

Не останавливаясь на деталях организации комплекса  $b-c_1$  (и других компонентов дыхательной цепи), которые подробно обсуждаются в специальных руководствах по биоэнергетике, отметим лишь, что многие вопросы остаются еще невыясненными. Так, в состав комплекса  $b-c_1$  входят две крупные «коровые» субъединицы, удаление которых приводит к потере комплексом ферментативной активности; функции же их до сих пор неизвестны. У некоторых бактерий комплекс  $b-c_1$  вообще не содержит таких компонентов и состоит всего из трех субъединиц — цитохрома  $b$ , цитохрома  $c_1$  и белка, содержащего FeS.

Как показали опыты на «вывернутых» субмитохондриальных пузырьках и данные, полученные различными другими методами, цитохром  $c$  локализуется на внешней поверхности внутренней мембраны митохондрий; у прокариот он располагается на внешней стороне цитоплазматической мембраны. В связывании цитохрома  $c$  с мембраной, видимо, принимает участие кардиолипин.

Следующий компонент дыхательной цепи — цитохромоксидаза — представляет собой комплекс, состоящий из субъединиц, число которых варьирует: у прокариот — две-три субъединицы, в митохондриях млекопитающих — три крупные и девять мелких, у дрожжей — три крупные и шесть мелких. Крупные субъединицы митохондриальной цитохромоксидазы гомологичны субъединицам прокариотического фермента.

Цитохромоксидаза эукариот обычно представлена димерами, расположенными в мембране таким образом, что большая часть молекулы (около 5,5 нм) выступает в межмембранное пространство, а меньшая (около 1,5 нм) — в матрикс; размер молекулы составляет около 11,5 нм.

Ферментативная система, которая осуществляет синтез АТФ, перекачивая протоны через мембрану, называется протон-



транслоцирующей АТФазой, АТФ-синтетазным комплексом (точнее, АТФ-синтазным) или  $H^+$ -АТФ-синтазой.

$H^+$ -АТФ-синтаза состоит из двух основных частей: сопрягающего фактора  $F_1$ , соответствующего головкам грибовидных телец, и мембранного компонента  $F_0$ .  $F_1$ -фактор обладает АТФазной активностью, но лишен способности к синтезу АТФ; такую способность он приобретает лишь в комплексе с  $F_0$ , мембранным компонентом, осуществляющим прохождение протонов через мембрану. В модельных опытах на мембранных пузырьках, лишенных  $F_1$ , было показано, что протоны пассивно проходят через мембрану и протонный градиент не создается.

$F_1$ -факторы, выделенные из разных источников, удивительно сходны по структуре.  $F_1$ -фактор состоит из субъединиц пяти типов:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - и  $\epsilon$ - молекулярной массой от 6 до 66 кДа. Количество субъединиц  $F_1$ -фактора может варьировать для разных объектов (у *Escherichia coli* по три  $\alpha$ - и  $\beta$ - и по одной  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -). Для  $H^+$ -АТФ-синтазы *E. coli* выяснена также аминокислотная последовательность и структура оперона, размер которого составляет около 7 килобаз.

Гомология  $\beta$ -субъединиц по аминокислотным последовательностям у филогенетически отдаленных видов достигает 70% (митохондрии сердца быка, дрожжей, мембрана *E. coli*, хлоропласты шпината).

Функциональная роль субъединиц фактора  $F_1$ , проанализированная с помощью иммуноцитохимии при блокировке соответствующими антителами активности той или иной субъединицы, представляется следующей. По-видимому, каталитическим центром  $F_1$  является  $\beta$ -субъединица;  $\alpha$ -субъединица выполняет регуляторную роль,  $\gamma$ -субъединица каким-то образом регулирует протонный поток, а  $\gamma$ -,  $\delta$ - и  $\epsilon$ - в совокупности могут формировать «ворота» для прохождения протонов.

Митохондриальный  $F_0$ -фактор состоит из субъединиц четырех типов; у прокариот — трех ( $a$ ,  $b$ ,  $c$ ). В одной молекуле  $H^+$ -АТФ-синтазы содержится одна субъединица типа  $a$ , две — типа  $b$  и от 6 до 15 — типа  $c$ . Дополнительная субъединица митохондриального фермента представляет собой белок, сообщаящий АТФ-синтазному комплексу чувствительность к олигомицину (обладающему ингибирующей активностью) — OSCP (oligomycin sensitivity conferring protein). Оказалось, что основная *E. coli*, а несколько участков —  $b$ -субъединице  $F_1$ -фактора.

Важную роль в работе митохондриальной  $H^+$ -АТФ-синтазы играет входящий в состав  $F_0$ -фактора так называемый ДЦКД-связывающий белок (ДЦКД — дициклогексилкарбодиимид — протеолипид, имеющий сродство к этому белку). Молекулярная масса этого белка варьирует от 6 до 9 кДа в зависимости от источника выделения. Для нескольких объектов определена его



аминокислотная последовательность; 80% аминокислот этого белка гидрофобны. Функция ДЦКД-связывающего белка, по-видимому, состоит в том, чтобы обеспечить протонам возможность пройти через мембрану, так как в мембранных пузырьках, лишенных  $F_1$ , связывание ДЦКД с этим белком препятствовало переносу протонов. Гомологом данного белка у прокариот является субъединица  $c$ . Мутация по любой из трех субъединиц  $F_0$ -фактора приводит к потере протонной проводимости у бактерий. Возможно, что субъединица  $c$  активно участвует в переносе протонов: в состав ее полипептидной цепи входит аспарагиновый остаток, расположенный в строго определенном месте (Asp 61) и необходимый для транспорта протонов — замена его на другую аминокислоту или блокировка связыванием с ДЦКД полностью прекращают перенос протонов (и синтез АТФ за счет энергии электрохимического градиента). Интересно отметить, что в ДЦКД-связывающем белке  $F_0$ -фактора митохондрий на этом месте находится глутамат, который также обязателен для работы протонного насоса.

Для работы АТФ-синтазного комплекса чрезвычайно важны мембранные липиды. Так, фактор  $F_0$  настолько тесно связан с окружающими фосфолипидами, что некоторые авторы часто включают их в его состав. При удалении фосфолипидов активность АТФ-синтазного комплекса резко падает: белок, сообщающий комплексу чувствительность к олигомицину (OSCP), также проявляет свои свойства только в присутствии фосфолипидов.

Каким образом соединяется  $F_0$ -фактор с  $F_1$  пока неизвестно.  $F_0$ — $F_1$ -комплекс представляет собой очень крупное образование; диаметр грибовидных головок, выявляемых при негативном контрастировании «вывернутых» субмитохондриальных пузырьков, составляет около 9 нм. (По-видимому, грибовидные структуры все-таки являются артефактом обработки, предшествующей электронно-микроскопическому исследованию.)

По результатам рентгеноструктурного анализа  $F_1$ -фактор представляет собой эллипсоид; компьютерная обработка электронно-микроскопических данных свидетельствует о том, что  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы упакованы в два слоя по три субъединицы в каждом. Группа из  $\gamma$ -,  $\delta$ - и  $\epsilon$ -субъединиц, по-видимому, располагается в центре комплекса.

Таким образом, к настоящему времени мы обладаем достаточно обширными сведениями об организации компонентов, отвечающих за процессы окислительного фосфорилирования. Однако несмотря на это, вопрос о том, каким образом на молекулярном уровне энергия протонного градиента превращается в химическую энергию АТФ, т. е. каков собственно механизм синтеза АТФ на уровне АТФ-синтазного комплекса, до сих пор остается открытым.

Еще одной стороной деятельности митохондрий является их



участие в специфических синтезах, например в синтезе стероидных гормонов (корковое вещество надпочечников) и отдельных липидов. В митохондриях могут накапливаться различные вещества и некоторые ионы, особенно ионы  $\text{Ca}^{2+}$ . В митохондриях ооцитов различных животных образуются скопления желтка, при этом они утрачивают свою основную функцию. Отрабатывшие митохондрии могут также накапливать продукты экскреции. Наконец, в некоторых случаях (печень, почки) митохондрии способны аккумулировать вредные вещества и яды, попадающие в клетку, изолируя их от основной цитоплазмы и частично блокируя вредное действие этих веществ.

Митохондрии представляют собой обновляющиеся структуры с довольно коротким жизненным циклом (в клетках печени крысы, например, период полужизни митохондрий составляет около 10 дней). Митохондрии образуются в результате роста и деления предсуществующих митохондрий. Этот процесс иногда идет очень быстро и с большой интенсивностью (в частности при адаптивных перестройках, как указывалось выше). Делятся митохондрии с помощью перетяжки.

Митохондрия имеет собственную генетическую систему — митохондриальную ДНК и собственный белоксинтезирующий аппарат. Делению (репродукции) митохондрий предшествует репликация митохондриальной ДНК. Синтез ДНК митохондрий при делении клеток происходит независимо от репликации ядерной ДНК.

У большинства объектов ДНК митохондрий представляет собой двухцепочечную ковалентно замкнутую структуру. В одной митохондрии может быть от одной до 20 000 кольцевых молекул ДНК, молекулярная масса которых варьирует от  $(9-10) \cdot 10^6$  у позвоночных до  $(3-4) \cdot 10^7$  у протистов, высших растений и грибов. Размеры кольцевых молекул ДНК в большинстве митохондриальных геномов варьируют от 16—20 (у позвоночных) до 570 килобаз у высших растений (кукуруза), а линейная длина молекулы составляет 5 мкм у дрожжей и 30 мкм у высших растений.

В митохондриях животных клеток содержится обычно несколько молекул ДНК, практически не заметных на обычных электронно-микроскопических препаратах. В клетках растений их, как правило, больше, так что при ультраструктурных исследованиях митохондриальная ДНК может быть выявлена в виде тонких фибрилл. И, наконец, в митохондриях некоторых кинетопластид (например, трипаносомовых) множество кольцевых молекул ДНК объединяются в крупную электронно-плотную структуру — кинетопласт. В единственной гигантской митохондрии кинетопластид обнаруживается интересная модификация митохондриального генома: генетический аппарат здесь представлен большим количеством кольцевых молекул двух типов — так называемых макси-колец (они гомологичны коль-



девым ДНК митохондрий других объектов) и миниколец — они почти не содержат генетической информации и их функциональное значение стало проявляться лишь в самое последнее время (см. ниже).

В редких случаях, например у водоросли хламидомонады и инфузорий парамеций, митохондриальный геном может состоять из линейных молекул ДНК.

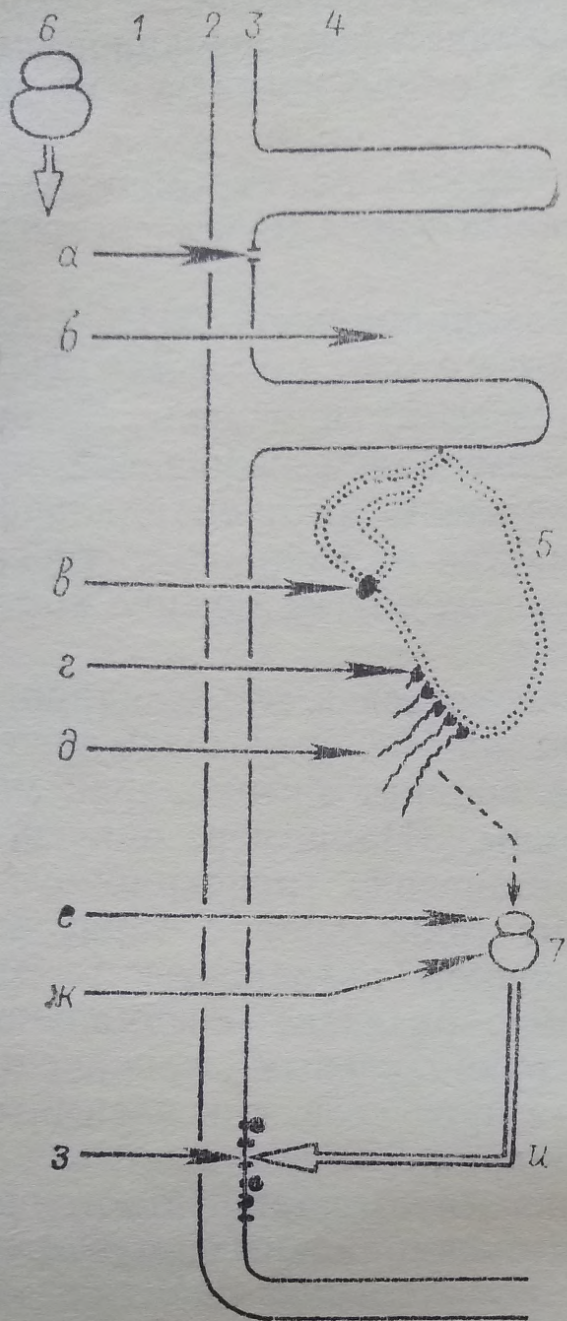
О надмолекулярной упаковке митохондриальной ДНК известно немного. По-видимому, фибриллы митохондриальной ДНК по способу упаковки напоминают хромосому прокариот. У некоторых объектов обнаружены основные белки небольшой молекулярной массы, как будто связанные с митохондриальной ДНК. Митохондриальная ДНК отличается от ядерной по составу оснований, плавучей плотности и ряду других физико-химических свойств.

Отдельные иРНК ядра могут переноситься в митохондрии и транслироваться там митохондриальной белоксинтезирующей системой — т. е. белоксинтезирующий аппарат митохондрий может использовать чужеродные матрицы. (Например, вирусная ДНК, взятая в качестве матрицы, интенсивно транскрибируется в митохондриях, затем происходит трансляция с образованием частиц, обладающих инфекционной активностью.) Это свойство митохондрий предопределило развитие специальной области исследований и дало в руки ученых прекрасное средство для изучения таких сложных процессов, как взаимный генетический контроль ядра и митохондрий.

Больших успехов достигла генетика митохондрий. Многочисленные работы проводятся на митохондриальных мутантах дрожжей (мутации, затрагивающие дыхательную цепь, не ведут к гибели клеток, так как они переходят на бродильный тип обмена). В исследованиях на культивируемых *in vitro* клетках удалось получить многочисленные митохондриальные мутанты у птиц, млекопитающих (в том числе и человека); были получены даже клетки с митохондриями, лишенными собственной ДНК.

Исследования в области митохондриальной генетики с использованием мутантных клеток позволили установить, что ДНК митохондрий свойственны все генетические функции: рекомбинация, репарация и т. д. Было показано, что митохондрии характеризуются так называемой полярностью, т. е. преобладанием у митохондрий дочерних клеток рекомбинантов одного типа: наследование митохондриального генома у животных и растительных клеток в основном идет по материнской линии. Правда, эти данные были получены на ограниченном числе объектов. В последнее время были обнаружены факты наследования обоих типов родительских митохондриальных геномов у животных клеток и наследование только по отцовской линии в растительных клетках (секвойя). Для обозначения этого яв-





ления — наличия у индивидуума более одного класса митохондриального генома (или генома хлоропластов; см. ниже) предложен специальный термин — гетероплазмия.

Исследования в области митохондриальной генетики позволили картировать митохондриальные геномы у разных объектов. В частности, имеется полная характеристика геномов митохондрий клеток человека и дрожжей; о других организмах существуют отрывочные сведения.

Рис. 41. Участие митохондриального и ядерного геномов в синтезе митохондриальных белков.

1 — цитозоль; 2 — наружная и 3 — внутренняя мембраны митохондрии; 4 — митохондриальный матрикс; 5 — ДНК митохондрий; 6 — цитоплазматическая и 7 — митохондриальная рибосомы. а—з — белки, синтезируемые в цитоплазме на основе иРНК ядерного генома: а — белки-переносчики внутренней мембраны; б — ферменты матрикса; в — факторы репликации; г — РНК-полимеразы; д — ферменты процессинга РНК; е, ж — белки миторибосом; з — некоторые субъединицы ферментов дыхательной цепи и АТФ-синтазного комплекса; и — белки, синтезируемые в митохондрии на основе иРНК митохондриального генома (некоторые субъединицы ферментов дыхательной цепи и АТФ-синтазного комплекса).

Объем информации, закодированной в геноме митохондрий, относительно невелик; митохондриальный геном, как правило, содержит матрицы для синтеза собственных тРНК и высокомолекулярных рРНК и некоторых субъединиц ферментов дыхательной цепи и АТФ-синтазного комплекса.

Автономность белоксинтезирующей системы митохондрий значительно меньше, чем кажется на первый взгляд. Белковые факторы трансляции митохондриальных РНК кодируются не ДНК митохондрий, а ядерной ДНК, т. е. процесс трансляции в митохондриях не может осуществляться независимо от ядерного генома. Кроме того, в ДНК ядра заключена информация, необходимая для синтеза факторов репликации митохондриальной ДНК, РНК-полимераз, осуществляющих транскрипцию ДНК митохондрий, белков, входящих в состав 70 S рибосом (за исключением одного белка малой субъединицы) и большей части компонентов электронтранспортной цепи и АТФ-синтазного комплекса (рис. 41).



В настоящее время большое внимание уделяется изучению механизмов транслокации белков через митохондриальные мембраны. Установлено, что многочисленные белки дыхательной цепи, АТФ-синтазного комплекса и матрикса проходят в митохондрии, по-видимому, в участках тесного контакта наружной и внутренней мембран — так называемых контактных сайтах (рис.

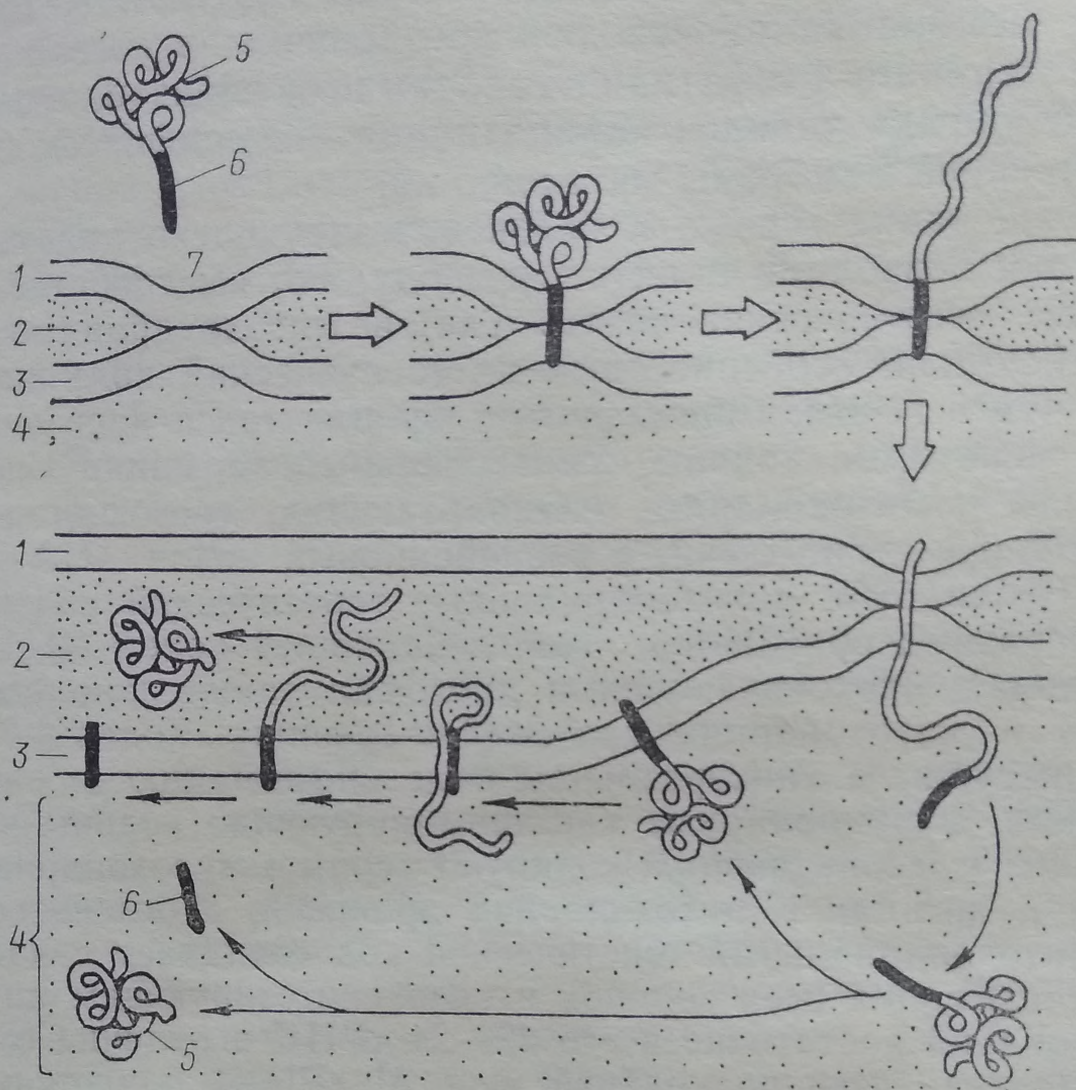


Рис. 42. Транслокация синтезированных в цитоплазме белков в митохондриальные компартменты.

1 — наружная мембрана; 2 — межмембранное пространство; 3 — внутренняя мембрана; 4 — матрикс; 5 — транслоцируемый белок; 6 — сигнальная последовательность транслоцируемого белка; 7 — сайт транслокации.

42). Здесь находится специальный белок-рецептор молекулярной массой 45 кДа, и образуются специфические каналы. Процесс этот требует энергии АТФ. Механизм транслокации белков через митохондриальные мембраны сходен с описанными ниже механизмами котрансляционного переноса белков через мембрану ЭПС — как и в том случае, у транслоцирующихся митохондриальных белков выявлены сигнальные последовательности, а в матриксе — отрезающие их протеазы. Кроме того, в процессах транслокации и посттранслокационных превращениях участвуют и другие специальные белки (см. ниже).



Этим же путем в матрикс могут попадать, по-видимому, и РНК, образующиеся в ядерном аппарате.

Большинство митохондриальных мембранных липидов синтезируется на ЭПС и встраивается в мембрану митохондрий. Липиды поступают к наружной мембране митохондрий (видимо, с помощью липидтранспортирующих белков) и попадают во внутреннюю мембрану через контактные сайты. В митохондриальных мембранах происходит превращение экзогенного фосфатидилсерина в фосфатидилэтаноламин и образование из «импортированных» липидов кардиолипина — специфического липида внутренней мембраны митохондрий.

Исследования генома и белоксинтезирующего аппарата митохондрий позволили прийти к выводу, что им свойственны некоторые специфические черты. Так, в митохондриях обладают существенными особенностями их генетический код: иное значение, чем в геномах прокариот, хлоропластов и ядер эукариот, имеют некоторые кодоны. Универсальный терминирующий кодон UGA в митохондриях млекопитающих, дрозофил и дрожжей кодирует триптофан, а изолейциновый кодон AUA — метионин. Более того, митохондриальный генетический код отличается у разных организмов. Так, лейциновый кодон GUA в митохондриях млекопитающих и дрозофил также кодирует лейцин, а в митохондриях дрожжей — треонин. Кодоны AGA и AGG, несущие в универсальном коде информацию для синтеза аргинина, функционируют как терминирующие кодоны в митохондриях млекопитающих, кодируют серин в митохондриях дрозофил и аргинин в митохондриях дрожжей. У высших растений митохондриальный генетический код совпадает с ядерным. Для считывания всех кодонов в белоксинтезирующем аппарате митохондрий достаточно всего 22—24 тРНК в отличие от цитозоля (где имеется по крайней мере 31 тРНК) и хлоропластов (30 тРНК); трансляция в митохондриях происходит с меньшей точностью; митохондриальные рибосомы также обладают определенными особенностями (см. выше).

Детальный анализ организации митохондриального генома человека и дрожжей нанес серьезный удар по представлениям об универсальности митохондрий эукариотных клеток. Оказалось, что эти два типа геномов существенно (и, пожалуй, принципиально) различаются.

Геном митохондрий человека относят к так называемому «экономному» типу. Основная информация закодирована в тяжелой цепи (H-цепи) ДНК (в ней локализуются гены двух высокомолекулярных рРНК, 14 тРНК и 12 генов, кодирующих иРНК для белков внутренней мембраны митохондрий). В легкой цепи (L-цепи) ДНК хранится информация только о 8 тРНК и одной иРНК для единственного белка малой субъединицы митохондриальных рибосом.

В тяжелой цепи отсутствуют спейсеры (некодирующие участ-



ки между генами) и интроны (некодирующие участки внутри гена); очень мало здесь и регуляторных последовательностей, т. е. почти каждый нуклеотид входит в состав кодона, содержащего информацию для синтеза белка или тРНК и рРНК. Гены тРНК рассредоточены по всей тяжелой цепи, а не собраны в кластеры. Репликация ДНК митохондриального генома «экономного» типа происходит по унирепликонному принципу. Транскрипция начинается в одной точке инициации и с ДНК митохондрии образуется два крупных транскрипта — с Н-цепи и с L-цепи, — которые затем обрабатываются эндонуклеазами; 90% транскрипта с L-цепи деградирует. Таким образом, по ряду принципиальных признаков организация митохондриального генома «экономного» типа сходна с организацией генома прокариот. Имеется, правда, и ряд специфических особенностей, например наличие в белоксинтезирующей системе митохондрий фермента, обеспечивающего полиаденилирование митохондриальных иРНК и отсутствующего у прокариот (см. ниже).

Принципиально иначе устроен митохондриальный геном дрожжевых клеток; он относится к так называемому «расточительному» типу. В обеих (Н- и L-) цепях митохондриальной ДНК дрожжей существует большой избыток нуклеотидных последовательностей, не несущих генетической информации: богатые АТ-парами участки, интроны и спейсеры.

Гены, как правило, разделены спейсерами, но некоторые из них собраны в группы — кластеры — и считаются полицистронно. Такой кластер составляют, например, гены двух типов иРНК и ген 21 S рРНК. В одну группу собраны здесь и 16 из 25 генов, кодирующих тРНК (в противоположность геному «экономного» типа, где гены тРНК рассредоточены по всей цепи ДНК). В митохондриях дрожжевых клеток имеется 13 точек инициации транскрипции и 4 точки инициации репликации, которая идет по полирепликонному принципу. Таким образом, по ряду весьма важных признаков митохондриальный геном низших эукариот оказывается сходным с ядерным геномом эукариот. К этим признакам относится большой избыток ДНК и наличие интронов (см. ниже). Интересно также, что в митохондриях дрожжей отсутствует фермент, осуществляющий полиаденилирование иРНК, который функционирует в митохондриях клеток позвоночных.

Принципиальные различия организации митохондриальных геномов «экономного» и «расточительного» типов можно объяснить с двух позиций: либо они отражают большую эволюционную пластичность генетических систем (их общее происхождение и изменчивость в ходе эволюции), либо, напротив, относительную стабильность митохондриальных геномов (т. е. происхождение их от разных предковых форм с сохранением некоторых признаков исходной организации).

В пользу первого предположения говорит тот факт, что опи-



санная выше организация генома *S. cerevisiae* характерна далеко не для всех видов дрожжей. Среди них есть как виды, геном которых по своей организации близок к митохондриальному геному позвоночных, так и виды, занимающие промежуточное положение. Однако широкий сравнительный подход к исследованию этой проблемы позволил обнаружить в организации митохондриальных геномов и черты, свидетельствующие об их эволюционной консервативности. К числу таких признаков относится относительное постоянство информационной емкости ДНК митохондрий. Как уже говорилось, в геномах обоих типов у подавляющего большинства изученных объектов митохондриальная ДНК кодирует все собственные вспомогательные РНК белоксинтезирующей системы (две высокомолекулярные рРНК и тРНК) и около 7—8 белков внутренней мембраны (ферменты дыхательной цепи и АТФ-синтазного комплекса).

Однако и в этом случае не обходится без исключений. Так, в митохондриях растений кодируется низкомолекулярная РНК рибосом. В митохондриальных геномах хламидомонады и инфузории тетрахимены содержится информация не обо всех тРНК: часть тРНК, работающих в митохондриях, закодирована в геноме ядра. А в ядерном геноме трипаносомид представлена информация обо всех тРНК митохондриальной белоксинтезирующей системы. Существенные различия наблюдаются между разными объектами и в кодировании белков дыхательной цепи и АТФ-синтазного комплекса. Таким образом, на фоне относительного постоянства информационной емкости митохондриального генома выявляется и значительная эволюционная пластичность этого признака.

### 3.3.2. ПЛАСТИДЫ

Пластиды—специфические «энергодающие» органоиды растительных клеток — подробно рассматриваются в курсах анатомии и физиологии растений. Поэтому в нашем учебнике им уделяется значительно меньше внимания, чем митохондриям.

Впервые пластиды были описаны А. Левенгуком в 1676 г. Интенсивное их изучение началось с конца XIX в. и продолжается в настоящее время в связи с анализом процессов фотосинтеза.

У высших растений выделяют следующие виды пластид: хлоропласты, лейкопласты и хромопласты, представляющие собой ряд взаимных превращений одного вида пластид в другой. Первые имеют преимущественно зеленый цвет, обусловленный присутствием хлорофилла, вторые бесцветны, а в третьих — красного, желтого или оранжевого цвета — хлорофилл маскируется большим количеством каротиноидов. Пластиды имеются во всех тканях у большинства высших растений, однако функцио-



нирующие хлоропласты обнаруживаются только в фотосинтезирующих тканях.

Число пластид на клетку значительно варьирует: от одной (у некоторых видов *Chlamydomonas*) до десятков и нескольких сотен (у высших растений). Обычно клетки высших растений содержат около 30 хлоропластов. Их размеры в среднем составляют 4—6 мкм.

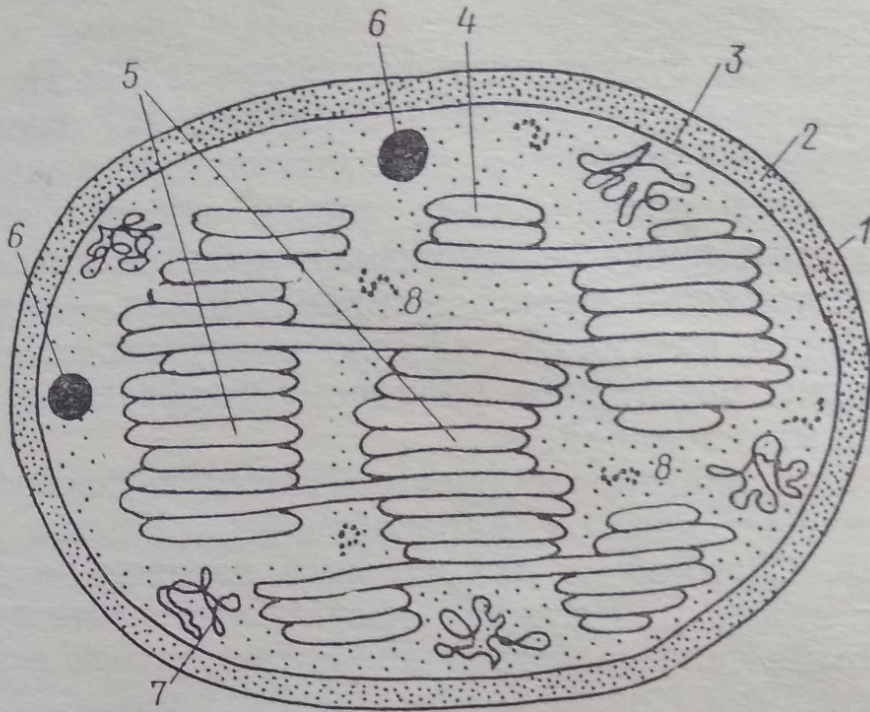


Рис. 43. Организация хлоропласта.

1 — наружная мембрана, 2 — межмембранное пространство, 3 — внутренняя мембрана, 4 — тилакоид, 5 — граны, 6 — пластоглобулы, 7 — ДНК, 8 — рибосомы.

Общий план строения хлоропластов одинаков и у водорослей, и у высших растений (рис. 43). Подобно митохондриям, хлоропласты имеют наружную и внутреннюю мембраны (также различающиеся по проницаемости), и строму, содержащую ДНК, рибосомы и включения (пластоглобулы, крахмальные зерна, белковые кристаллы). Кроме того, хлоропласты имеют систему внутренних мембран, формирующих плоские мешочки, называемые тилакоидами. В строме хлоропласта тилакоиды могут располагаться поодиночке (агранулярные тилакоиды) или собираться в стопки, образуя так называемые граны. Число тилакоидов в гранах разных клеток может быть неодинаковым, так же как число гран в хлоропластах. Обычно пластиды имеют эллипсоидную форму.

Варьируя условия содержания растений, можно изменить структуру хлоропластов, которая зависит от различных факторов, в том числе изменений уровня освещенности, минерального питания, оттока сахаров, содержания гормонов и др. Лабильность хлоропластов выражается еще и в том, что мембраны соседних хлоропластов могут сливаться; это явление наблюдалось с помощью микрокино съемки.



В мембранах тилакоидов сосредоточен фотосинтезирующий аппарат: белок-пигментные комплексы, электронтранспортная цепь и протонтранслоцирующая АТФаза. В строме хлоропластов располагаются ферменты цикла Кальвина, необходимые для темновой фазы фотосинтеза. В результате поглощения света электроны в хлорофилле переходят на более высокий энергетический уровень; эта энергия используется при синтезе АТФ и восстановителя.

В хлоропластах существуют фотосистемы I и II, образованные двумя формами хлорофилла с различными спектрами поглощения (длинноволновая и коротковолновая системы). Совместное функционирование этих систем обеспечивает окисление воды. В этом процессе принимают участие цитохромы  $b_{559}$ ,  $b_{563}$ ,  $f_{557}$ , пластоциан — медьсодержащий белок — и редокс-белки ферродоксины, витамин  $K_1$  (филлохинон) и пластохинон. Названные хиноны родственны убихинону (коферменту Q) дыхательной цепи митохондрий.

Переносчики электронов располагаются в мембранах тилакоидов в виде комплексов, наподобие дыхательных ансамблей митохондрий. С помощью специальных методов на мембранах тилакоидов можно обнаружить сферические частицы, сходные с грибовидными телами митохондрий; так же как и последние, они представляют собой АТФ-синтазный комплекс.

Сходство хлоропластов с митохондриями не ограничивается общими чертами в организации энергетических процессов. Как и митохондрии, хлоропласты имеют собственную генетическую систему — ДНК хлоропласта — и собственный белоксинтезирующий аппарат. Так же как и митохондрии, хлоропласты делятся. Этот процесс можно наблюдать на живых клетках с помощью микрокиносъемки. Делению хлоропластов предшествует репликация их ДНК. Обычно хлоропласты делятся независимо от клеточного деления, однако в ряде случаев (некоторые водоросли) деление хлоропластов (как правило единичных) приурочено к последней стадии телофазы и происходит непосредственно перед цитотомией.

Наследование хлоропластов чаще всего смешанное. Ни у одной из исследованных групп растений не наблюдается наследования строго по какой-либо одной родительской линии; встречаются случаи как материнского, так и отцовского наследования (хвойные), а также смешанные варианты (цветковые растения). Нужно отметить, что даже у тех объектов, где наследование хлоропластов идет преимущественно по отцовской линии или является смешанным, у митохондрий преобладает наследование по материнской линии. Правда, следует иметь в виду, что данные по наследованию хлоропластов (как и митохондрий) получены на ограниченном круге объектов.

ДНК хлоропластов не гомологична ядерной и отличается от нее плавучей плотностью и содержанием ГЦ-пар. ДНК име-

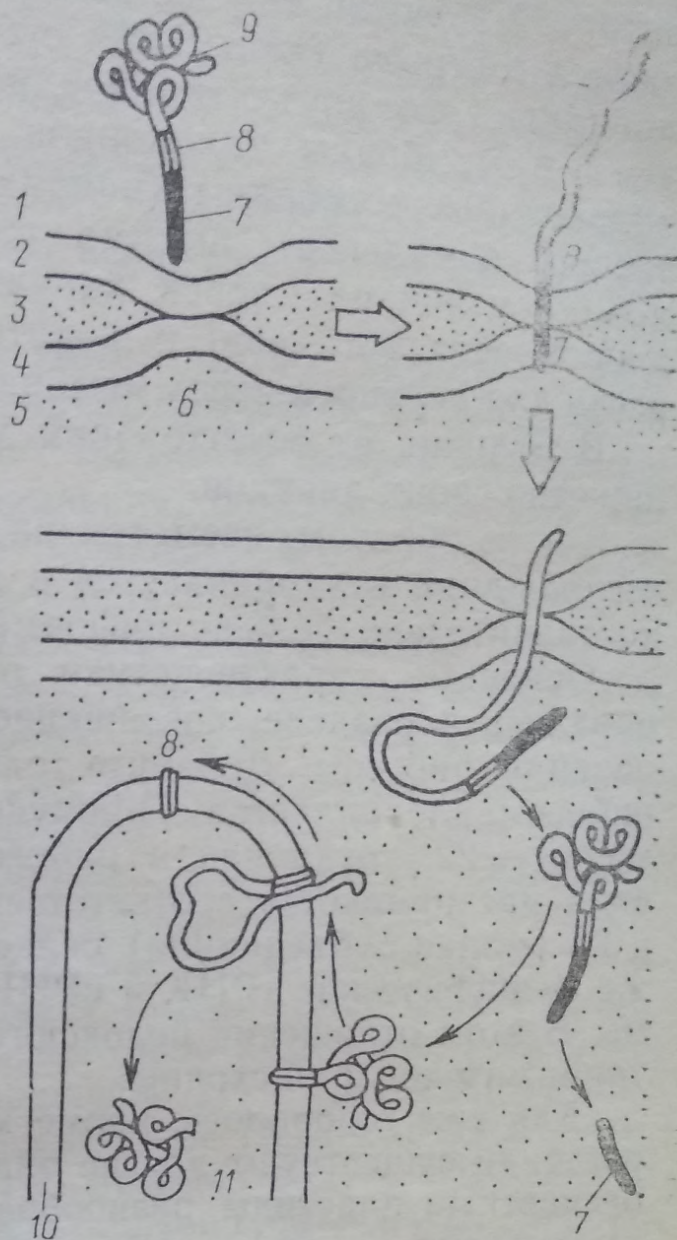


ет кольцевую форму; в среднем контурная длина ДНК хлоропластов, выделенных из клеток как водорослей, так и высших растений, составляет около 40 мкм. В каждом хлоропласте содержится в среднем несколько десятков молекул ДНК. ДНК хлоропластов состоит примерно из 120—200 тыс. нуклеотидных пар; она способна кодировать по крайней мере 100—150 белков.

Организация генома хлоропластов сходна с таковой у прокариот (см. ниже).

Рис. 44. Транслокация белков в строму и тилакоидное пространство хлоропластов.

1 — цитозоль; 2 — наружная мембрана; 3 — межмембранное пространство; 4 — внутренняя мембрана; 5 — строма; 6 — сайт транслокации; 7—9 — транслоцируемый белок (9) с сигнальными последовательностями для переноса в стро-  
му (7) и в тилакоид (8); 10 — тилакоидная мембрана; 11 — тилакоидное пространство.



Лучше всего изучен геном хлоропластов некоторых высших растений и зеленых водорослей. Известна полная нуклеотидная последовательность ДНК и картирован геном хлоропластов табака и печеночника *Marchantia polymorpha*. Эта ДНК кодирует часть собственных рРНК (4) и тРНК (30), около 20 рибосомальных белков, некоторые субъединицы РНК-полимеразы, несколько белков, входящих в состав фотосистем I и II, некоторые субъединицы АТФ-синтазного комплекса и ферментов электронтранспортной цепи и большую субъединицу белка RuBisCo — рибулезо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы-оксигеназы. (Этот белок, состоящий из больших и малых субъединиц и содержащийся в стромах хлоропластов в больших количествах, являющийся одним из ключевых ферментов ассимиляции  $\text{CO}_2$ .) Кроме этого, ДНК хлоропласта, по-видимому, кодирует около 40 белков, функция которых пока неизвестна. Информация для синтеза остальных белков хлоропластов (включая РНК-полимеразы и внерибосомные белковые факторы трансляции) закодирована в ДНК ядра. Белки, синтезируемые в цитоплазме, транслируются в хлоропласты через контактные сайты (рис. 44) с



затратой энергии, так же как у митохондрий, а затем либо остаются в строме (как малая субъединица белка Rubisco), либо проникают во внутритилакоидное пространство или встраиваются в мембраны тилакоидов. У белков, встраивающихся в тилакоидные мембраны (например, некоторые белки АТФ-синтазного комплекса), помимо сигнальных последовательностей для транслокации через наружную и внутреннюю мембраны хлоропласта есть еще и короткая сигнальная последовательность для переноса через мембрану тилакоидов.

В отличие от митохондрий хлоропласты синтезируют большинство своих липидов.

Таким образом, несмотря на значительное сходство геномов митохондрий и хлоропластов в ДНК хлоропластов закодировано значительно больше информации, чем в ДНК митохондрий.

Основные характеристики рибосом хлоропластов рассматривались в разделе, посвященном морфофункциональной организации рибосом. Добавим только, что большая субъединица рибосом хлоропластов *Chlamydomonas* содержит 26 белков, а малая — 22, тогда как в рибосомах цитоплазмы клеток этого вида насчитывается соответственно 39 (большая субъединица) и 26 (малая субъединица) белков. Хлоропласты включают также специфические тРНК и иРНК, не обнаруженные в цитоплазме. В этом отношении белоксинтезирующие системы хлоропластов и митохондрий сходны.

Как уже говорилось, кроме хлоропластов в клетках высших растений существуют другие виды пластид. Так, лейкопласты — бесцветные пластиды разнообразной формы (шаровидные, эллипсоидные и др.) — встречаются в запасающих тканях. В лейкопластах питательные вещества откладываются в виде включений, содержащихся в строме. Система тилакоидов лейкопластов весьма слабо развита. Хромопласты, содержащие каротиноиды, имеются в тканях цветков и плодов. В их строме располагаются одиночные тилакоиды.

В клетках зеленых растений постоянно наблюдается процесс перехода пластид одного вида в другие. Например, лейкопласты, интенсивно накапливая крахмал, превращаются в амилопласты (в основном это осуществляется в темноте). На свету лейкопласты способны зеленеть — формировать тилакоиды и превращаться в хлоропласты. В процессе развития лепестков или созревания плодов хлоропласты переходят в хромопласты, при этом частично разрушается система тилакоидов, исчезают каротиноиды. Хромопласты представляют собой неактивные дегенерирующие пластиды.

### 3.3.3. СОПРЯГАЮЩИЕ МЕМБРАНЫ

Одной из ключевых проблем биоэнергетики долго оставался вопрос о том, как осуществляется сопряжение процессов окис-



ления и фосфорилирования. То, что это происходит, было выяснено еще в 30-х годах Энгельгардтом. В 50—60-е гг. господствовала химическая гипотеза сопряжения, утверждавшая, что АТФ образуется из промежуточных продуктов, богатых энергией. Но многочисленные попытки выделить эти соединения успеха не имели.

В 1961 г. английский ученый Питер Митчел предложил чисто умозрительную схему сопряжения, базируясь на следующих фактах: процесс сопряжения идет только на уровне мембраны; промежуточные химические соединения, богатые энергией, выделить не удастся; между многочисленными веществами, разобщающими процессы фосфорилирования и дыхания, нет химического сходства. Митчел выдвинул хемиосмотическую гипотезу, которая постулирует, что ферменты-переносчики электронов ориентированы в мембране особым образом, вследствие чего протоны, захваченные по одну сторону мембраны и высвобождаемые в ходе окислительно-восстановительных реакций, оказываются по другую сторону мембраны; в результате создается разность концентрации ионов, т. е. электрохимический потенциал; энергия окисления переходит в энергию электрохимического потенциала. Ясно, что этот градиент может существовать лишь при наличии непроницаемой для протонов мембраны. Выравнивание ионных градиентов (возвращение  $H^+$  в матрикс) производится другой ферментативной системой (АТФ-синтазой), которая и осуществляет синтез АТФ, отнимая воду у АДФ и неорганического фосфата. Эти представления объясняют, почему исчезновение протонного градиента вследствие нарушения целостности мембраны приводит к подавлению окислительного фосфорилирования, что и происходит при действии многочисленных разобщителей процессов дыхания и фосфорилирования, лишенных химического сходства, но обладающих другим общим свойством — способностью переносить через мембрану ионы водорода, т. е. выравнивать протонный градиент.

Идея Митчела вначале не привлекла внимания, и в 1966 г. появилась конформационная гипотеза сопряжения, согласно которой энергия переноса электронов переходит в механическую энергию конформационных изменений компонентов митохондриальных мембран; «конформационная» энергия передается АТФ-синтазе, образующей прочный комплекс с дыхательным ферментом. Релаксация (расслабление) АТФ-синтазы ведет к синтезу АТФ.

Однако в многочисленных экспериментальных исследованиях выявлялось все больше и больше фактов, свидетельствующих в пользу взглядов Митчела, и, наконец, в 1973 г. Э. Рэкером и У. Стокениусом было представлено наиболее яркое из всех полученных к тому времени доказательств справедливости хемиосмотической гипотезы. В своих экспериментах они использовали протеолипосомы — пузырьки, образованные путем самосборки



мембран из отдельных компонентов: в мембраны из фосфолипидов сои были встроены АТФ-синтаза митохондрий сердца быка и взятый в качестве генератора протонов бактериородопсин плазматической мембраны архебактерии *Halobacterium halobium* (рис. 45). Оказалось, что такие пузырьки при освещении генерируют АТФ. Ясно, что бактериородопсин не может образовывать каких-то высокоэнергетических химических соединений — предшественников АТФ; ясно также, что и конформационная теория сопряжения здесь не работает — бактериородопсин в мембране бактерий не контактирует ни с какими другими белками.

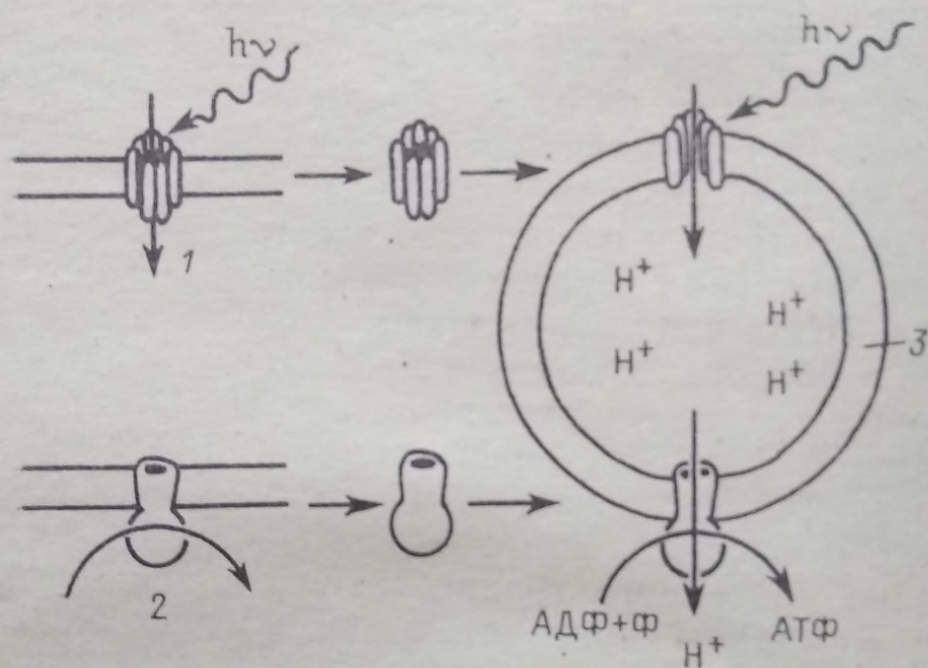


Рис. 45. Схема опыта Э. Рэкера и У. Стокениуса.  
1 — бактериородопсин; 2 — АТФ-синтаза; 3 — мембрана липосомы.

Таким образом, основная идея хемиосмотической гипотезы оказалась абсолютно справедливой: энергия внешних ресурсов аккумулируется в виде энергии трансмембранного потенциала в результате переноса электронов по цепям, составленным из ломентов и коферментов; затем эта энергия используется для совершения полезной работы разных видов, в том числе и синтеза АТФ с помощью сопрягающего фактора. Эти процессы происходят в так называемых сопрягающих мембранах. По традиционному представлению к ним относили мембраны, несущие цепь переноса электронов и АТФ-синтазу, в совокупности образующую систему окислительного фосфорилирования (например, внутренняя мембрана митохондрий); т. е., говоря о процессах сопряжения дыхания и фосфорилирования. В последнее время это



понятие стало применяться более широко, и к сопрягающим, или энергопреобразующим, мембранам стали относить любые мембраны, способные осуществлять превращение одной формы энергии в другую с помощью трансмембранной разности потенциалов и прежде всего мембраны тилакоидов хлоропластов. Наконец, по В. П. Скулачеву, энергопреобразующей мембраной является и внешняя плазматическая мембрана животных клеток, которая использует  $\text{Na}^+$  в качестве иона, сопрягающего гидролиз АТФ с транспортом в клетку различных метаболитов. Однако в данном разделе мы будем пользоваться термином «сопрягающие мембраны» в узком смысле, имея в виду мембраны, способные осуществлять именно окислительное фосфорилирование. К такого рода мембранам, кроме внутренней мембраны митохондрий, относятся плазматическая мембрана прокариот и внутриклеточные мембраны, образующие хроматофоры фотосинтезирующих бактерий. Плазматическая мембрана бактерий содержит систему окислительного фосфорилирования; по молекулярной организации эта мембрана сходна с внутренней мембраной митохондрий. На плазматической мембране бактерий обнаружены грибовидные тельца, представляющие собой АТФ-синтазу. Все эти мембранные структуры способны образовывать АТФ; во всех этих структурах трансформация энергии осуществляется по сходным принципам.

Сопрягающие мембраны характеризуются повышенным содержанием белков (соотношение липид:белок здесь равно 1:2), низкой концентрацией холестерина и наличием кардиолипина. Среди белков значительную долю составляют редокс-ферменты: цитохромы, флавопротеины и т. д. Энергия, сообщенная сопрягающей мембране, может быть использована для совершения нескольких видов полезной работы и образования тепла. Это может быть химическая работа — синтез АТФ и других макроэргических соединений и перенос электронов против термодинамического градиента; электрическая работа — трансмембранный перенос зарядов против электрического градиента (образование электрического мембранного потенциала); осмотическая работа — перенос веществ через мембрану против концентрационного (осмотического) градиента.

В ряде случаев энергия может не аккумулироваться в АТФ, а непосредственно использоваться на энергетические потребности внутриклеточного метаболизма. Так, при активном переносе ионов в матрикс митохондрии используется энергия с дыхательной цепи — АТФ в это время не образуется. В митохондриях могут накапливаться  $\text{Ca}^{2+}$  и другие двухвалентные катионы ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ). Катионы накапливаются в основном в виде конкреций фосфатных солей, количество которых варьирует в зависимости от функционального состояния данной клетки и типа дифференцировки ткани; в костной ткани, которой свойственна кальцификация межклеточного вещества, митохондрии



могут накапливать  $\text{Ca}^{2+}$  в больших количествах. Так же обстоит дело и в мышечной ткани, хотя в данном случае основным депо кальция, необходимого для запуска сокращения мышцы, являются L-каналы — видоизмененная гладкая эндоплазматическая сеть; тем не менее, митохондрии могут частично брать на себя такую функцию. Наконец, иногда требуется на какое-то время удалить избыток  $\text{Ca}^{2+}$  из цитоплазмы — это также могут делать митохондрии. Возможно, что накопление конкреций фосфата кальция несет еще и регуляторную функцию в процессах синтеза АТФ.

Подобное явление — переход энергии, сообщенной сопрягающей мембране, в другой вид энергии без образования АТФ — наблюдается и у бактерий, где энергия протонного градиента используется непосредственно для обеспечения движения жгутика (см. рис. 23).

Закономерности транспортных процессов, установленные на сопрягающих мембранах, Митчел предложил распространить на систему активного транспорта в целом. По его мнению, все разнообразие процессов аккумуляции веществ в живых системах обеспечивается, как правило, работой одного из двух основных механизмов активного транспорта. Первый из них — протонный насос, локализованный в сопрягающих мембранах, т. е. во внутренней мембране митохондрий и хлоропластов и плазматической мембране бактерий. Другой механизм — натриевый насос, представленный К- $\text{Na}$ -АТФазой, обеспечивает активный транспорт ионов  $\text{Na}^+$  через мембрану. Прочие вещества транспортируются против градиентов концентрации за счет электрохимического градиента ионов  $\text{H}^+$  (сопрягающие мембраны) или ионов  $\text{Na}^+$ . Одним из доказательств справедливости этой концепции является транспорт лактозы в клетки *E. coli*. Движущей силой транспорта лактозы против концентрационного градиента служит электрохимический потенциал  $\text{H}^+$ , создаваемый на плазматической мембране бактерии в результате дыхания или гидролиза АТФ. Лактоза соединяется с переносчиком, который присоединяет также и ион  $\text{H}^+$ . Перенос полученного комплекса идет по электрохимическому градиенту  $\text{H}^+$  и напоминает перенос остатков жирных кислот в митохондрию посредством карнитина. Это свидетельствует о значительной универсальности такого механизма транспорта.

Еще один пример, подтверждающий широкое распространение подобного механизма, — наличие электрохимического потенциала ионов  $\text{H}^+$  на плазматической мембране *Streptococcus faecalis* — бактерии, единственным механизмом энергообеспечения которой служит гликолиз; дыхательное фосфорилирование у нее отсутствует, и тем не менее электрохимический потенциал на мембране существует. Он поддерживается гидролизом АТФ, образуемой гликолитическим путем. В таких мембранах градиент ионов  $\text{H}^+$  не может выполнять своей основной функ-



нии — служить связующим звеном между переносом электронов и образованием АТФ, и мембранный потенциал здесь, по-видимому, создается специально для транспорта ионов.

Способность трансформировать энергию является универсальной для всех сопрягающих мембран; энергетическим базисом сопряжения служит мембранный потенциал.

Мембранный потенциал генерируется на любой из мембранных систем, если она способна осуществлять энергетическое сопряжение. Этот вывод оказывается справедливым независимо от степени сложности системы сопряжения (интактные митохондрии или фрагменты мембран), положения объекта на эволюционной лестнице, характера энергетических ресурсов (субстрат окисления, свет, АТФ).

Сходство систем генерации мембранного потенциала в митохондриях млекопитающих и хроматофорах фотосинтезирующих бактерий является одним из наглядных примеров общности принципов трансформации энергии в мембранных структурах живой клетки. Другой яркий пример — взаимозаменяемость белковых сопрягающих факторов, необходимых для фосфорилирования во фрагментах бактериальных мембран и в частицах митохондрий млекопитающих; подобная замена может быть, например, произведена и между митохондриями клеток печени крысы и *Escherichia coli*.

Как отмечалось выше, обнаруживается сходство и на молекулярном уровне организации систем, обеспечивающих энергетическое сопряжение (эволюционная консервативность компонентов дыхательной цепи и АТФ-синтазного комплекса). Еще одним примером подобного рода является организация фотосинтетического реакционного центра пурпурных фотосинтезирующих бактерий — белкового комплекса, локализованного в мембране и содержащего три субъединицы (Н-, М- и L-), по крайней мере, две из которых (М- и L-) эволюционно консервативны (у хлоропластов гомологичная пара белков входит в состав фотосистемы II). Такая же гомология существует и между компонентами реакционного центра I фотосистемы хлоропластов и единственной фотосистемой зеленых одноклеточных бактерий *Chlorobium*, а также недавно открытых гелиобактерий. У зеленых нитчатых бактерий *Chloroflexus* единственная фотосистема сходна с фотосистемой II хлоропластов. Все эти факты иллюстрируют вариации в организации систем энергетического сопряжения: так, электроны при бактериальном фотосинтезе поступают от легкоокисляющихся субстратов и в данном случае вполне достаточно фотосистемы, поглощающей свет в дальней красной области спектра. Об этом же свидетельствует и разнообразие дыхательных цепей, встречающихся у разных организмов и отличающихся по субстратам, длине, терминальным акцепторам и т. д.

Вопросы детальной организации различных систем энергети-



ческого сопряжения все еще далеки от разрешения и являются предметом интенсивных исследований; более того, как уже говорилось, точно неизвестен и механизм синтеза АТФ на уровне АТФ-синтазы. Не менее принципиальное значение имеет и выяснение того, является ли  $H^+$  единственным сопрягающим ионом, как считалось по классическим представлениям. В последние годы появились данные о том, что во многих случаях ион  $Na^+$  заменяет ион  $H^+$  в процессах, связанных с превращениями энергии. Так, у ряда бактерий показано существование сопряженного с дыханием транспорта  $Na^+$ ; удалось также выделить  $Na^+$ -транспортирующую NADH-хиноноксидоредуктазу. По-видимому, возможно и сосуществование в мембране  $Na^+$ - и  $H^+$ -транспортирующих дыхательных цепей.

В мембранах морской бактерии *Vibrio alginolyticus* обнаружена  $Na^+$ -АТФаза, чувствительная к ДЦКД и похожая по субъединичному составу на  $F_1$ -фактор; этот фермент катализирует образование АТФ из АДФ и фосфата, транспортируя в цитоплазму ионы  $Na^+$ , выбрасываемые из клетки в процессе декарбоксилирования субстрата. Интересно отметить, что в отсутствие  $Na^+$   $Na^+$ -АТФаза может переносить ионы  $H^+$ .

Кроме того, движение жгутика ряда бактерий может основываться на разности концентраций  $Na^+$ , а не  $H^+$ .

В. П. Скулачеву и его сотрудникам удалось продемонстрировать наличие в клетках *V. alginolyticus* полного натриевого цикла, когда электрохимический градиент  $Na^+$  генерируется  $Na^+$ -транспортирующей NADH-хиноноксидоредуктазой и используется  $Na^+$ -АТФ-синтазой для синтеза АТФ, симпорта  $Na^+$  и ряда метаболитов и совершения механической работы (вращения флагеллы с помощью натриевого мотора).

Однако эта проблема еще очень мало исследована; прежде всего необходимо решить вопрос о том, насколько широко распространен «натриевый мир» (по выражению Скулачева) и, в частности, механизмы синтеза АТФ за счет транспорта  $Na^+$ .

### 3.3.4. БИОГЕНЕЗ ЭНЕРГООБРАЗУЮЩИХ ОРГАНОИДОВ

Давно привлекает внимание исследователей, но, тем не менее, далек от окончательного разрешения вопрос о происхождении митохондрий и хлоропластов — органоидов клетки, обладающих известной автономностью. В настоящее время существуют три теории происхождения энергопреобразующих оргanelл — ксеногенетическая (симбиотическая), автогенетическая и комбинированная (допускающая ксеногенетическое происхождение одних оргanelл и автогенетическое — других).

Симбиотическое происхождение митохондрий постулировалось еще в 1890 г. Р. Альтманом, а по поводу пластид подобные взгляды были высказаны в 1905 г. К. С. Мережковским. Эти идеи сохранили свое значение и до сих пор. Основой теории симбиотического происхождения энергопреобразующих оргanelл — теории симбиогенеза или ксеногенеза (греч. «ксе-



нос» — чужой) — служит представление о том, что проэукариотная клетка приобрела эндосимбионта, сходного с бактериями и обладающего дыхательной активностью, или фотосинтезирующего эндосимбионта, возникшего от оксигенных фототрофных бактерий. Эти представления базировались на морфофункциональной конвергенции, существующей между митохондриями и аэробными бактериями с одной стороны, и между хлоропластами и оксигенными фототрофными бактериями, с другой. Такие взгляды были подробно и последовательно развиты в работах Л. Маргелис. В пользу этой точки зрения говорят следующие факты: определенная близость организации генома митохондрий и прокариот; кольцевая ДНК, связанная с мембраной; подобие генетических свойств митохондрий и бактерий; одинаковый способ размножения — деление; одинаковая чувствительность РНК-полимераз бактерий и митохондрий к антибиотикам; определенное сходство белоксинтезирующих систем, например, инициация синтеза с формилметионил-тРНК; взаимозаменяемость белковых факторов инициации и элонгации у митохондрий и бактерий и ее невозможность для митохондрий и цитоплазмы и т. д.

Однако столь же весомые аргументы свидетельствуют и против симбиотической теории. Например, объем генома и соответственно генетической информации у митохондрий и прокариот значительно различается; интронная структура генома свойственна митохондриям и не характерна для прокариот; существует жесткий контроль за деятельностью митохондриального генома со стороны ядра; многие РНК и белки митохондрий кодируются ядром; иРНК митохондрий содержит большое количество полиадениловых остатков, что характерно для эукариот, но не прокариот; белоксинтезирующий аппарат митохондрий (в том числе и рибосомы) значительно отличается от прокариотного; генетический код митохондриального генома уникален и т. д.

Теория, постулирующая автогенетическое происхождение митохондрий и хлоропластов, предполагает эндогенную компартментализацию протоэукариотной клетки, в которой дифференцировались соответствующие системы, впоследствии конвертировавшиеся с прокариотами. По этой теории протоэукариотная клетка — высокоорганизованная аэробная система с дыхательными ферментами в плазматической мембране, — была значительно больше по размеру, чем современные прокариотные клетки. Среди изменений, сопутствовавших увеличению ее размера, было разрастание респираторной поверхности, которое сопровождалось вначале инвагинацией плазматической мембраны, а затем отшнуровыванием инвагинировавших участков и генерацией замкнутых пузырьков. (В пользу этой точки зрения может свидетельствовать тот факт, что в цитоплазме у некоторых прокариот обнаруживаются мембранные структуры.)



Множество аргументов, обосновывающих теорию автогенетического происхождения митохондрий и хлоропластов, приводится в своих обзорах Л. Н. Серавин, рассматривая этот вопрос не только относительно биогенеза митохондрий, но и как общую проблему эволюции клеток. С его точки зрения сходство в организации геномов и сопрягающих мембран органелл можно объяснить общностью их происхождения и длительной эволюцией в прогенотном состоянии. Однако такое сходство могло возникнуть и как новообразование на одной основе в двух или даже трех параллельно эволюционирующих системах (проэубактериальных, проархебактериальных и проэукариотных). Именно так рассматривает Л. Н. Серавин происхождение хлоропластов и митохондрий. По его мнению, эти органеллы несомненно имеют автогенетическое происхождение и их сходство с бактериями обусловлено именно явлениями параллелизма на мембранном и молекулярно-генетическом уровнях.

Согласно симбиотической теории взаимоотношения генома органелл и ядра выглядят следующим образом. Большинство генов возникшего эндосимбионта были вскоре либо перенесены в ядро, либо утрачены вообще. Некоторые из них могли быть функционально заменены предсуществовавшими ядерными генами. В эволюции растений можно найти примеры подобных преобразований. Так, ген, кодирующий фактор элонгации белоксинтезирующего аппарата хлоропласта, содержится в ДНК хлоропласта у харовых и зеленых водорослей; у наземных растений он находится в ядерном геноме. Его нет в ДНК хлоропласта уже у печеночников — это одна из первых ветвей наземных растений. У ряда паразитических растений происходит полная потеря способности к фотосинтезу; при этом некоторые из них не имеют хлорофилла, другие лишены каких-либо ферментов фотосинтеза, например Rubisco. Соответствующие изменения происходят и в геноме этих растений. Так, хлоропласты нефотосинтезирующего корневого паразита *Epifagus virginico* утратили почти все гены, отвечающие за фотосинтез (около 30), и ряд других — размер ДНК его хлоропластов составляет около 70 килобаз, тогда как размер обычного пластидного генома — 120—220 килобаз. В то же время у одной из родственных форм — также паразитической, содержащей полный набор генов фотосинтетического аппарата. В ядерном геноме эукариот обнаруживается также обилие нефункционирующих нуклеотидных последовательностей «органелльного» типа — т. е. характерных для генома органелл.

Однако все эти данные, вероятно, можно объяснить и параллелизмом на молекулярно-генетическом уровне. Наиболее веским доказательством эволюционного родства организмов в настоящее время служат данные по молекулярной гомологии. Степень гомологии рРНК у митохондрий и пурпурных



бактерий весьма высока; однако наиболее высок процент гомологии рРНК у хлоропластов и цианобактерий; различия по этому признаку между двумя группами цианобактерий могут быть значительно больше, чем у цианобактерий и хлоропластов. Эти данные (как и многие другие) учитывает комбинированная теория происхождения энергопреобразующих органелл, постулирующая ксеногенетическое происхождение хлоропластов и автогенетическое — митохондрий.

К сожалению, все теории происхождения клеточных органелл относятся к числу тех, которые в настоящее время нельзя ни полностью подтвердить, ни целиком опровергнуть. Можно лишь сказать, что эволюция органелл — длительный и очень сложный процесс, многие детали которого нам совершенно не известны. А это как раз та ситуация, в которой возникают самые различные интерпретации и гипотезы.

С общецитологической точки зрения результаты сопоставлений белоксинтезирующих систем прокариот, эукариот, митохондрий и хлоропластов представляют большой интерес не только для выяснения их родственных отношений. В случае справедливости симбиотической теории происхождения органелл приведенные выше факты о подчиненности их белоксинтезирующего аппарата генетической системе эукариотной клетки показывают, какую огромную роль играют интегративные клеточные механизмы в эволюции этих симбиотических органелл эукариотных клеток.

Некоторые элементы подобной эволюции удастся наблюдать на одной из линий амёб, культивируемых в течение многих лет в лабораторных условиях. В цитоплазме этих амёб обнаруживаются два рода образований: ограниченные мембраной плотные тела, содержащие ДНК, и бактерии, вокруг которых формируется специальная изолирующая мембрана. Эти бактерии сохраняют жизнеспособность только в цитоплазме амёб данной линии и при их размножении передаются дочерним клеткам. Предполагают, что в данном случае мы имеем дело с ранним (бактерии) и более поздним (плотные тела, содержащие ДНК) этапами подчинения симбионтов интегративным механизмам эукариотных клеток.

С позиций автогенетической теории происхождения и эволюции митохондриальных белоксинтезирующих систем их принципиальное сходство и с прокариотными, и с эукариотными системами также представляет большой общецитологический интерес и может быть объяснено следующим образом. В данном случае, по-видимому, имеет место независимое возникновение белоксинтезирующего аппарата по общему для всех живых систем типу. Отмеченные выше существенные особенности митохондриального белоксинтезирующего аппарата, отличающие его от таковых у прокариот и в цитоплазме эукариот, отражают еще одну, третью модификацию в организации



белоксинтезирующих систем, реализуемую на основе принципиально общих элементарных механизмов. Естественно, что сравнительный анализ таких механизмов во всех разновидностях белоксинтезирующих систем очень важен для разработки этой одной из наиболее кардинальных проблем современной биологии.

### 3.4. МЕМБРАННЫЕ ОРГАНОИДЫ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО И КАТАБОЛИЧЕСКОГО ОБМЕНОВ

#### 3.4.1. ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ СЕТЬ (ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКИЙ РЕТИКУЛУМ)

Эндоплазматическая сеть (ЭПС) — сравнительно «молодой» мембранный органоид. История ее изучения началась с внедрения в практику цитологических исследований методов ультраструктурного анализа. Открытие эндоплазматической сети и доказательство наличия ее во всех эукариотных клетках нанесли серьезный удар по взглядам на цитоплазму как на бесструктурную коллоидную систему и легли в основу современных представлений о трехфазной организации цитоплазмы и универсальности принципа компартментализации и структурированности биохимических процессов.

Существуют две разновидности ЭПС: шероховатая и гладкая (рис. 46); они ограничены мембраной толщиной 6—7 нм. Шероховатая ЭПС представляет собой уплощенные цистерны, на поверхности которых располагаются многочисленные рибосомы. Гладкая ЭПС, как правило, представлена тубулярными образованиями — системой переплетающихся трубочек, каналов и пузырьков небольшого диаметра. Между шероховатой и гладкой ЭПС существует структурная взаимосвязь вследствие прямого перехода мембран одного типа в мембраны другого; каналы и цистерны этих разновидностей ЭПС не разграничены специальными структурами. В некоторых клетках можно выделить промежуточный тип эндоплазматической сети, представляющий собой часть шероховатого ретикулума, утратившего рибосомы. Обычно такая сеть контактирует с аппаратом Гольджи. Именно в этих участках ЭПС происходит образование транспортных пузырьков, обеспечивающих связь ЭПС с аппаратом Гольджи (см. ниже).

Развитие двух типов эндоплазматической сети в онтогенезе идет не одновременно. Так, у гепатоцитов в эмбриональном гистогенезе гладкая ЭПС возникает только на относительно поздних этапах развития, когда клетки уже обладают хорошо выраженной системой шероховатой ЭПС.

Несмотря на структурную связь, обе разновидности ЭПС



представляют собой достаточно дифференцированные органеллы метаболического аппарата, обеспечивающие выполнение разных функций.

Одна из главных и важнейших функций шероховатой ЭПС — обеспечение синтеза белков на прикрепленных рибосомах и внутриклеточного их транспорта. Выделяют три основные группы таких белков: 1) секреторные белки, транспортируемые во внеклеточное пространство; 2) некоторые белки клеточных мембран; 3) специфические белки внутренней фазы мембранных органеллов (ЭПС, аппарата Гольджи, лизосом и матрикса митохондрий).

Степень развития шероховатой ЭПС может варьировать. Так, в клетках, специализированных на процессы синтеза и секреции специфических белков, необходимых для реализации общих функций организма (например, в экзокриновой части поджелудочной железы позвоночных), шероховатая ЭПС представлена комплексом уплощенных цистерн, расположенных в базальном отделе клетки; причем ее цистерны занимают здесь основную часть цитоплазмы. Число прикрепленных рибосом в этом случае настолько велико, что они образуют сплошной слой, контактирующий с таким же слоем рибосом соседней мембраны. В других клетках шероховатая ЭПС может быть представлена одиночными цистернами, разбросанными по цитоплазме.

Шероховатая ЭПС может специализироваться на синтез и транспортировку как одного вида белка (например, в плазматических клетках лимфоидной системы позвоночных), так и нескольких. В последнем случае возможны два варианта осуществления мультисинтетической деятельности клетки: без видимой морфологической дифференцировки белоксинтезирующего аппарата (секреторные клетки поджелудочной железы, гепатоциты и др.) и при отчетливой дифференцировке шероховатой сети и комплексов Гольджи на различные участки соответственно разным типам вырабатываемого клетками белкового секрета (полиплоидные клетки слюнных желез некоторых двукрылых насекомых).

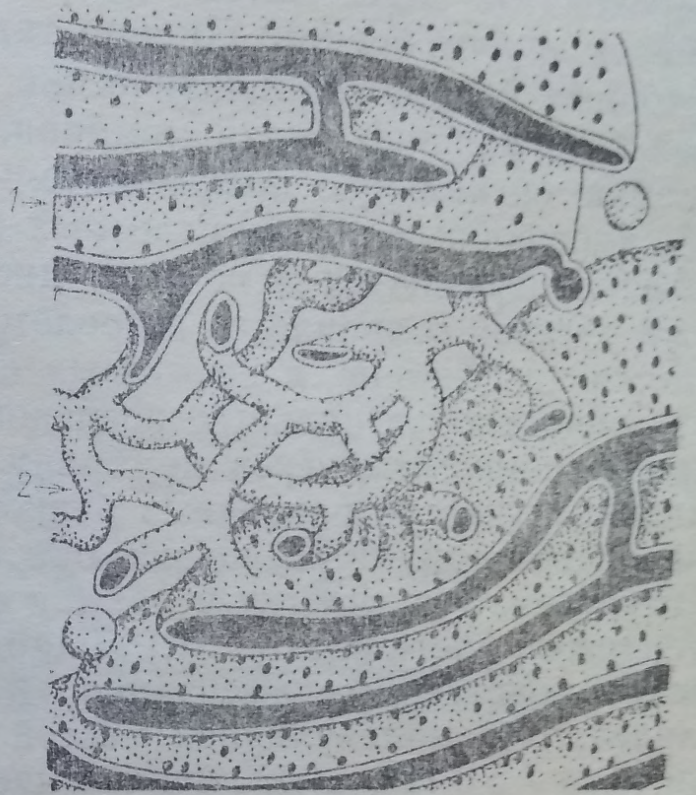


Рис. 46. Шероховатая (1) и гладкая (2) эндоплазматическая сеть.



Большие успехи достигнуты за последнее время в изучении тонких механизмов работы шероховатой ЭПС. Еще в начале 70-х годов было обнаружено, что легкая цепь иммуноглобулинов сначала синтезируется на прикрепленных рибосомах шероховатой ЭПС в виде длинного предшественника, а конечный продукт — более короткая цепь — обнаруживается в цистернах шероховатой ЭПС. Затем оказалось, что это характерно и для многих других белков. Именно таким путем синтезируются секреторные белки, гидролитические ферменты лизосом и некоторые интегральные белки мембран. Все они содержат так называемую сигнальную последовательность: как правило, это 15—30 гидрофобных аминокислотных остатков на N-конце, которые обычно отрезаются в полости цистерны. Иногда этот сигнальный участок сохраняется в зрелом белке, не всегда он располагается на N-конце, в некоторых случаях в молекуле существует несколько сигнальных последовательностей для каждого из транслоцируемых через мембрану доменов белковой цепи. Сигнальные участки различных белковых цепей не гомологичны по первичной структуре, но все они образуют сходную третичную структуру. Эти участки узнаются специальными рибонуклеопротеидными частицами — SRP (signal recognition particle), имеющими константу седиментации 11 S и состоящими из шести полипептидов молекулярной массой от 9 до 72 кДа и одной молекулы 7 S РНК из 300 нуклеотидов.

Свободные SRP в цитоплазме находятся в равновесии с SRP, ассоциированными с рибосомами. При появлении сигнальной последовательности сродство SRP к рибосоме возрастает. Связавшись с только что синтезированной сигнальной последовательностью, SRP останавливает элонгацию. Затем рибосома с SRP подходит к мембране ЭПС, где локализуется интегральный мембранный белок 72 кДа, узнающий SRP — SRP-рецептор, или причальный белок (docking protein).

SRP-рецептор имеет крупный цитоплазматический домен, содержащий аминокислотные последовательности, гомологичные белкам, связывающимся с нуклеиновыми кислотами. Этот домен, по-видимому, взаимодействует с 7 S РНК, входящей в состав SRP, ассоциированной с рибосомой.

После того, как взаимодействие произошло, связи между SRP, SRP-рецептором и рибосомой нарушаются: SRP, отделившись от рибосомы, переходит в гиалоплазму, а высвободившийся SRP-рецептор свободно перемещается в плоскости мембраны. Вследствие этого запрет на элонгацию снимается и возобновляется синтез белка. Образующийся полипептид по мере синтеза продвигается в цистерну шероховатой сети через канал, состоящий из шести белков, составляющих комплекс сигнальных пептидаз, одна из которых и отрезает сигнальную последовательность. При этом рибосома, по-видимому, взаимодействует с какими-то интегральными белками мембраны, удержи-



вающими ее на поверхности цистерны ЭПС. Эту роль ранее приписывали двум белкам молекулярной массой 65 и 63 кДа — рибофоринам I и II, однако прямых доказательств их участия в процессе взаимодействия рибосом с мембраной пока нет. В последнее время появился новый кандидат на эту роль — белок молекулярной массой 180 кДа, имеющий, как и SRP-рецептор, крупный цитоплазматический домен.

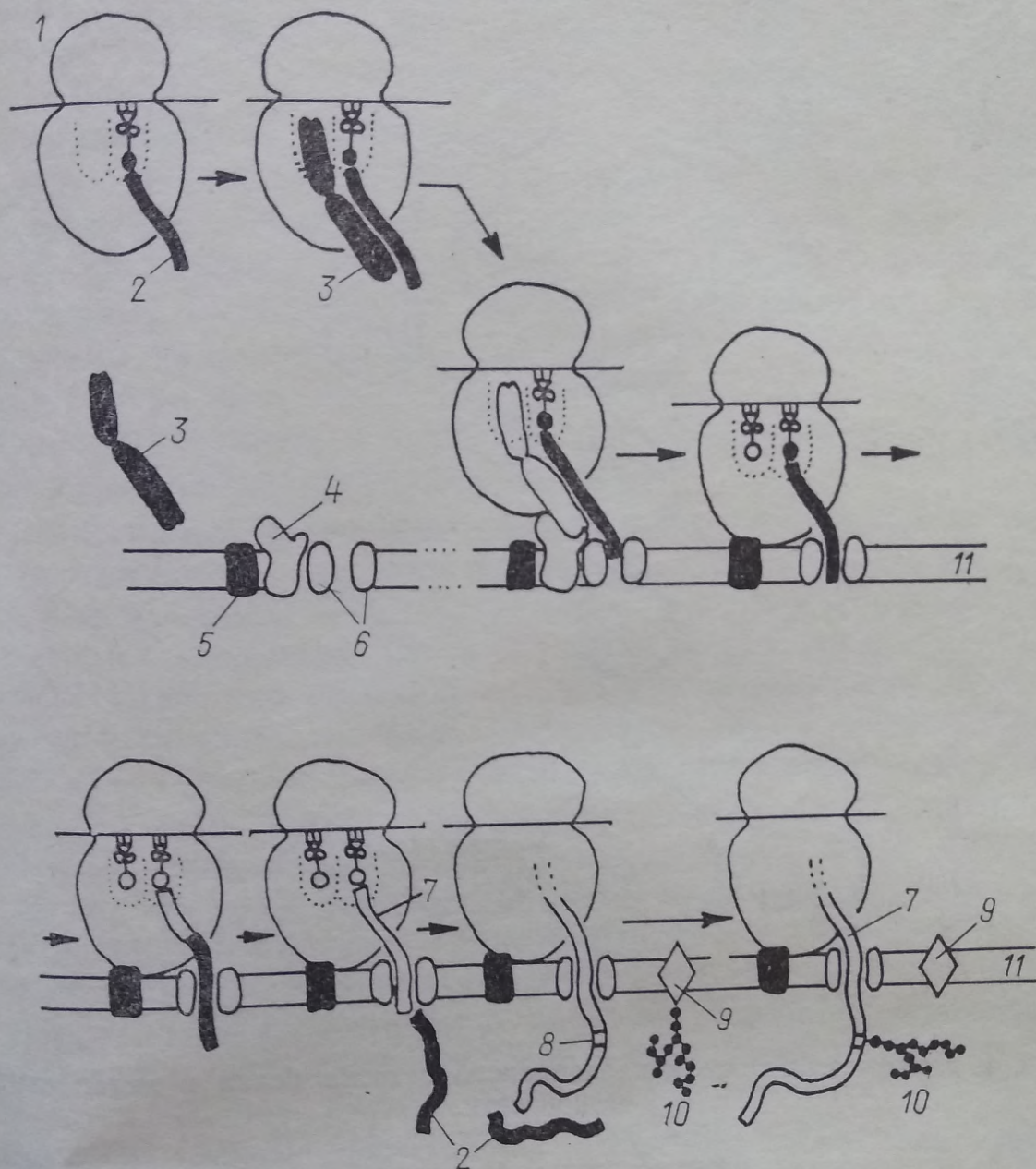


Рис. 47. Сигнальная гипотеза.

1 — рибосома; 2 — сигнальный пептид; 3 — SRP-частица; 4 — SRP-рецептор (причальный белок); 5 — белок, фиксирующий рибосому на мембране; 6 — комплекс сигнальных белков; 7 — растущий пептид; 8 — аспарагиновый остаток растущего пептида; 9 — до-пептидаз; 10 — олигосахаридная группа; 11 — мембрана ЭПС.

Таким образом, первым и универсальным шагом котрансляционной (т. е. происходящей во время трансляции) обработки белков (рис. 47), идущей в цистернах шероховатой ЭПС, является отрезание пептидазами сигнальных последовательностей. Затем к аспарагиновому аминокислотному остатку белка присоединяется сложный олигосахарид, состоящий, как правило, из



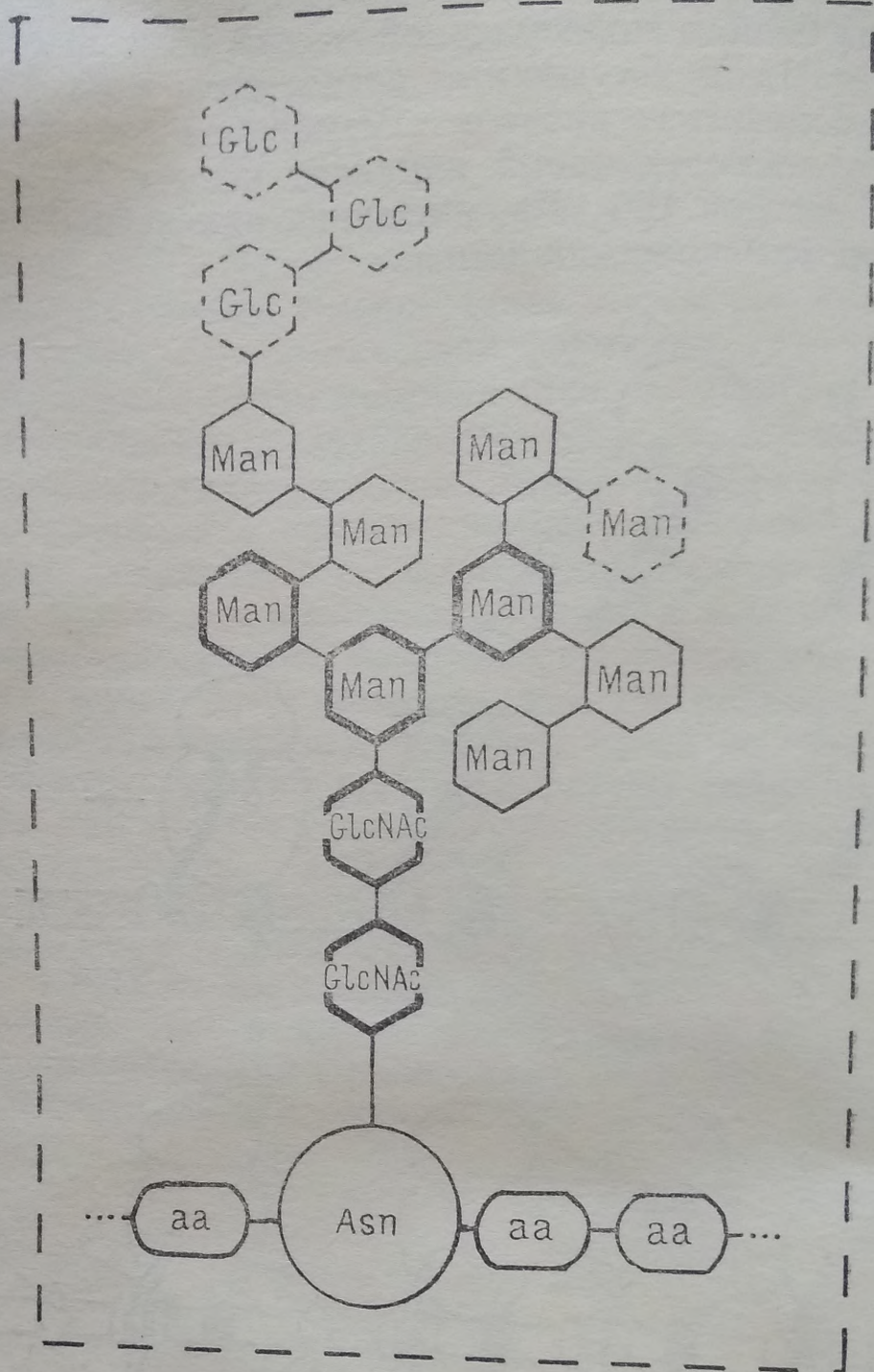


Рис. 48. N-гликозилирование аспарагинового остатка белка в эндоплазматической сети.

Asn — аспарагиновый остаток, aa — прочие аминокислотные остатки. Glc — глюкоза, GlcNAc — N-ацетилглюкозамин, Man — манноза. Пунктирной линией обозначены остатки сахаров, удаляемых в ЭПС, жирной — пятичленный кор.

двух остатков N-ацетилглюкозамина, девяти остатков маннозы и трех глюкозы. Олигосахарид собирается на внутренней поверхности мембраны ЭПС, взаимодействуя с липидом доли на синтезирующийся белок, связываясь с  $\text{NH}_2$ -группой аспарагина. Этот процесс носит название N-гликозилирования (рис. 48). Впоследствии все три глюкозных остатка и один из маннозных с ним происходят дальнейшие превращения, которые будут рассмотрены нами в соответствующем разделе (см. ниже).



В шероховатой ЭПС производится также и разнообразная посттрансляционная (т. е. происходящая после завершения трансляции) обработка белка: присоединение к белковым молекулам углеводных, фосфорных или липидных остатков, ацетилирование, образование дисульфидных мостиков, вырезание участков молекулы (протеолитический процессинг) и целый ряд других модификаций.

В цистернах шероховатой сети осуществляется также и правильная укладка синтезированных белковых молекул, которая обеспечивается белком BiP (binding protein или связывающий белок — см. ниже), содержащимся в полости цистерны.

Рассмотренный выше механизм транспорта белков через мембраны шероховатой ЭПС, основанный на наличии у них дополнительных сигнальных последовательностей, широко используется при синтезе и внедрении в мембраны разнообразных мембранных интегральных белков — как с одним, так и с несколькими гидрофобными участками. У многих из них также имеется одна или несколько сигнальных последовательностей, которые отрезаются в процессе посттрансляционной обработки с помощью соответствующих пептидаз.

В настоящее время идут интенсивные исследования конкретных механизмов всех этих процессов. Детализированы строение и функция белков SRP. Оказалось, что они образуют два естественных мономера (54 и 19 кДа) и два гетеродимера (9/14 и 68/72 кДа), способных к самосборке и восстановлению функциональных свойств SRP. Выяснена также конкретная роль этих субъединиц на разных этапах функционирования SRP: мономер 54 кДа узнает сигнальную последовательность, димер 9/14 кДа останавливает элонгацию, а димер 68/72 кДа отвечает за начало транслокации. Однако, несмотря на существенные достижения в анализе трансмембранного транспорта белков, многие детали этого процесса все еще остаются невыясненными.

Протеинтранслоцирующие системы подобного рода, по-видимому, достаточно универсальны. Так, сходным образом осуществляется перенос белков через мембрану хлоропластов и митохондрий (см. выше). У грациликотных бактерий обнаружены системы, обеспечивающие перенос белков наружной мембраны и периплазматического пространства через их внутреннюю плазматическую мембрану к месту назначения. У этих транспортируемых белков имеются сигнальные последовательности; в периплазматическом пространстве обнаружены две разновидности специфических пептидаз, отрезающих «сигналы», показано также наличие в цитоплазме бактерий SRP. То есть компоненты протеинтранслоцирующих систем прокариотных клеток, аналогичные таковым у эукариот, по-видимому, представляют собой звенья древнего механизма, обеспечивающего перенос белков на ранних этапах эволюции, а такие компоненты, как SRP-ре-



цепторы (причальные белки) или рецепторы рибосом являются специфическим приобретением эукариотных клеток.

Таким образом, одной из важнейших функций шероховатой ЭПС является ко- и посттрансляционная обработка, транспорт и начальные этапы сортировки большинства синтезируемых клеткой белков (лизосомальных, секреторных и большей части мембранных интегральных белков).

Еще одна важная функция ЭПС — участие в метаболизме липидов. В мембранах эндоплазматической сети (преимущественно гладкой) происходит синтез почти всех липидов клеточных мембран. Синтез липидов происходит обычно в несколько этапов и катализируется ферментами, локализованными в липидном слое мембраны.

Например, образование фосфатидилхолина идет в три этапа. Вначале из глицерофосфата и жирных кислот с помощью мембранного фермента ацетилтрансферазы синтезируется и встраивается в мембрану гидрофобная фосфатидная кислота. На следующем этапе под действием фермента фосфатазы фосфатидная кислота превращается в диацилглицерол. И, наконец, молекула диацилглицерола, присоединив холин с помощью фермента холинфосфотрансферазы, превращается в фосфатидилхолин.

Именно такая, структурированная на мембране, сборка мембранных липидов и создает предпосылки для образования и поддержания асимметрии билипидного слоя естественных клеточных мембран. Тем не менее, поскольку синтез липидов происходит обычно в монослой, контактирующем с цитоплазмой, должны существовать механизмы их транслокации из этого слоя в наружный монослой мембраны. Действительно, в мембранах ЭПС работают соответствующие липидтранслоцирующие белки («флиппазы»), обеспечивающие такие перемещения липидных молекул и тем самым активно поддерживающие асимметрию липидного состава в двух слоях мембраны. Кроме того, имеются еще и специальные белки-переносчики, отвечающие за транспортировку липидов из мембраны ЭПС в мембраны других органоидов.

Степень развития гладкой ЭПС (так же, как и шероховатой) варьирует как в разных типах клеток, так и в одной клетке в зависимости от условий среды. Очень хорошо выражена гладкая ЭПС в гепатоцитах позвоночных, где она специализирована на детоксикацию вредных продуктов метаболизма и токсических веществ, попавших в кровяное русло. При действии барбитурата фенобарбитала гладкая ЭПС гепатоцитов в течение нескольких дней разрастается вдвое, впоследствии возвращаясь к нормальному состоянию (избыток сети уничтожается аутофагическим путем — см. ниже).

Процессы детоксикации в гладкой сети осуществляются с помощью вмонтированных в мембрану ферментов семейства ци-



тохромов  $P_{450}$ . При этом вредные для клетки липофильные соединения переводятся в водорастворимую форму и экскретируются из организма с мочой. Цитохромы  $P_{450}$  имеются почти во всех тканях животных и в ряде тканей у растений. В некоторых случаях (кора надпочечников) эти ферменты локализованы в митохондриях. У бактерий *Pseudomonas putida* цитохром  $P_{450}$  содержится в растворенном виде в цитоплазме. Встраивание фермента в мембраны, по-видимому, обеспечило эволюционно продвинутым формам более высокую специфичность и более совершенную регуляцию метаболических реакций.

Еще один пример специализации гладкой ЭПС обнаруживается в клетках коры надпочечников позвоночных животных. Здесь ЭПС осуществляет синтез предшественников стероидных гормонов и представлена системой густо расположенных и переплетающихся трубчатых структур. Аналогичное строение имеет гладкая ЭПС в клетках растений, синтезирующих терпеноиды. Последние находятся в биохимическом родстве со стероидными гормонами.

На основе гладкой ЭПС в клетках могут формироваться и другие специализированные структуры. Так, в хлоридных клетках жаберного эпителия костистых рыб образуется трехмерная разветвленная сеть трубочек — тубулярный ретикулум, пронизывающий всю цитоплазму и обеспечивающий транспорт ионов — основную функцию хлоридных клеток. При адаптации рыб к гипертонической среде происходит гипертрофия тубулярного ретикулума, отвечающего за выведение ионов из клетки.

Еще один пример специализированных структур, образованных на основе гладкой ЭПС, можно найти в мышечной ткани.

В поперечно-полосатых соматических мышцах позвоночных гладкая ЭПС образует по ходу миофибрилл мышечного волокна в определенных районах каждого саркомера (участка с правильным расположением актиновых и миозиновых протофибрилл) систему расширенных цистерн, именуемых L-каналами. Своей внешней стороной они контактируют с T-каналами (поперечными впячиваниями плазматической мембраны). В этих участках в примембранной гиалоплазме обнаруживаются характерные электронно-плотные структуры, связывающие мембраны T- и L-каналов и образованные прилегающими друг к другу надмембранными участками молекул интегральных белков. Эти белки в T-каналах представлены дигидропиридиновыми рецепторами, названными так за способность специфически связываться с дигидропиридином. Их молекулы содержат гидрофобные  $\alpha$ -спиральные участки, пронизывающие мембрану около десяти раз, и являются натриевыми каналами. В состав мембраны L-каналов входят так называемые рианодиновые рецепторы, имеющие специфическое сродство к алкалоиду рианодину. Они расположены в мембране строго упорядоченно. Каждый рецептор представляет собой тетрамерный белковый комплекс, состо-



ящий из одинаковых полипептидных единиц молекулярной массой 400—450 кДа, семь раз прошивающих мембрану и образующих правильную структуру (рис. 49). По своей организации они напоминают холинрецептивные белки постсинаптических мембран (см. выше). Риаудиновые рецепторы являются, по-видимому, регулируемые ионными каналами и служат для выхода в цитоплазму  $\text{Ca}^{2+}$  в ответ на сигнал (нервный импульс), который передается при помощи натриевых каналов — дигидропиридиновых рецепторов Т-системы — на мембраны L-системы.

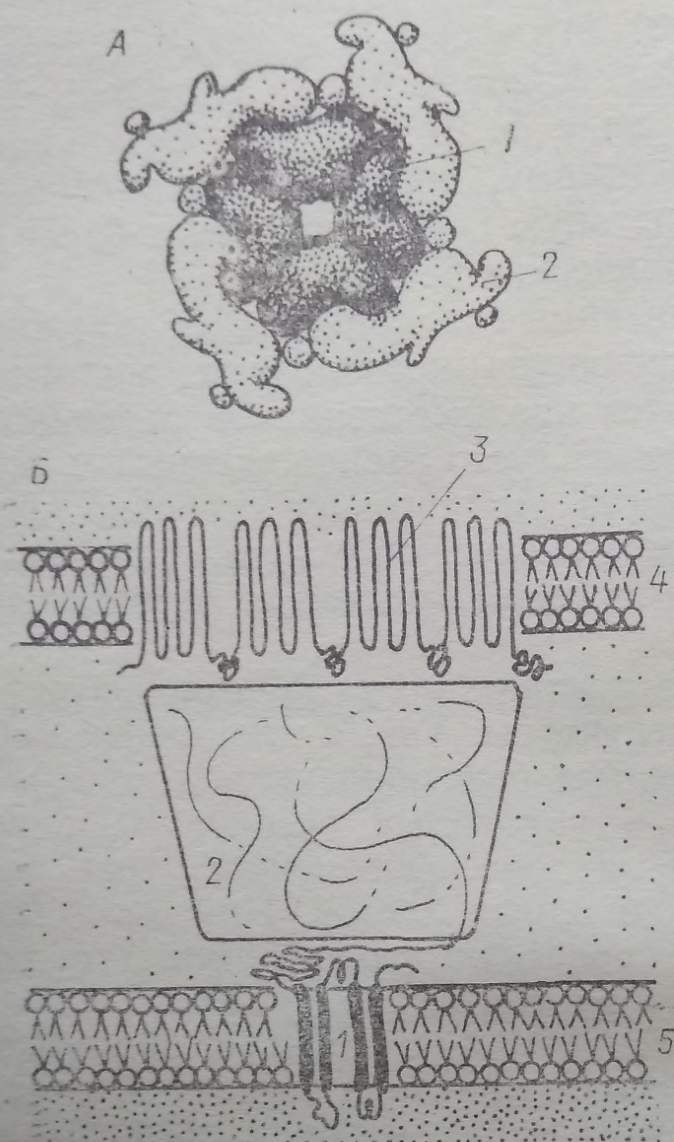


Рис. 49. Каналы, обеспечивающие транспорт кальция в мышечных волокнах.

4 — тангентальный, Б — поперечный срез. 1 — мембранная и 2 — надмембранная части риаудинового рецептора; 3 — дигидропиридиновый рецептор; 4 — мембрана Т-системы; 5 — мембрана L-системы.

Сходную с риаудиновыми рецепторами структурно-функциональную организацию имеют и кальциевые каналы, обнаруженные недавно в немых мышечных клетках самых различных организмов. Они расположены в мембранах ЭПС и ее производных — органоидов кальцийсом, представляющих собой специализированные депо  $\text{Ca}^{2+}$ , и служат для вывода кальция в цитоплазму в ответ на сигнал, которым является взаимодействие белков канала с инозитолтрифосфатом. Эти белки носят название рецепторов к

инозитолтрифосфату (рис. 50). Каждый рецептор состоит из четырех одинаковых полипептидных единиц, семь раз прошивающих мембрану. Рецепторную часть комплекса формируют N-концы полипептидных цепей, C-концы обращены в полость цистерн (в отличие от риаудиновых рецепторов, молекулы которых имеют обратную ориентацию). Взаимодействие рецепторов с циклической АМФ приводит к ингибированию работы кальциевых каналов. Активация же вторичных мессенджеров — и инозитолтрифосфата, и цАМФ — происходит, как указывалось выше, через систему специфических рецепторов плазматической мембраны, связанных с G-белками.



В полости кальциевых депо — будь то специализированные системы (кальцийсомы, L-каналы) или цистерны ЭПС — сосредоточены кальцийсвязывающие белки — кальсеквестрин и др., по-видимому, регулирующие (ограничивающие) количество не-связанного и способного к выходу в цитоплазму  $\text{Ca}^{2+}$ .

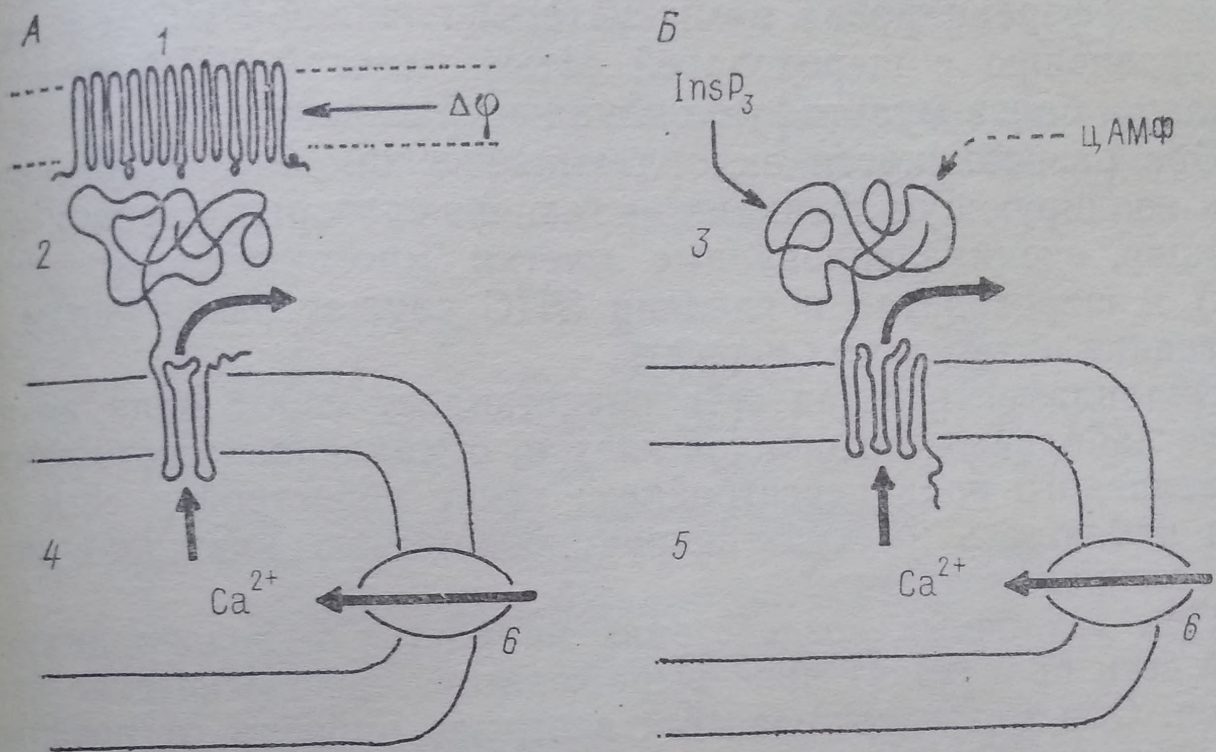


Рис. 50. Схема работы рианодиневого рецептора (А) и рецептора к инозитолтрифосфату (Б).

1 — дигидропиридиновый рецептор в мембране Т-канала; 2 — рианодиневого рецептора в мембране L-канала; 3 — рецептор к инозитолтрифосфату; 4 — полость L-канала; 5 — мембрана L-канала; 6 — Са-АТФаза. Толстыми стрелками показано перемещение  $\text{Ca}^{2+}$  в депо, тонкими — сигнал, стимулирующий выход  $\text{Ca}^{2+}$ , штриховой — ингибирующий сигнал.

Для переноса ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в депо существуют специальные насосы, расположенные в мембранах гладкой ЭПС —  $\text{Mg}$ -зависимая Са-АТФаза, представленная одной полипептидной цепью молекулярной массой 120 кДа. Она имеет гидрофобную мембранную часть и расположенный в примембранном цитозоле крупный гидрофильный участок. В мембранах L-каналов Са-АТФаза составляет 70—90% мембранных белков. При закачивании ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цистерны используется энергия АТФ.

В сравнительно-цитологических исследованиях обнаружили интересный пример использования L-каналов не по прямому назначению. У некоторых океанических рыб окологлазные мышцы утрачивают сократимые элементы и содержат гипертрофированную систему гладкой сети и большое количество митохондрий. Рианодиневого рецепторы и Са-АТФаза в этом случае обеспечивают не процессы сокращения, а выработку тепла, благодаря чему температура крови, поступающей в головной мозг рыб, на  $10^\circ\text{C}$  и более выше, чем в других участках тела.



Таким образом, гладкая ЭПС может транспортировать и накапливать ионы, осуществлять детоксикацию вредных продуктов обмена, обеспечивать синтез мембранных и немембранных липидов; при этом имеет место не только качественная структурно-биохимическая специализация ЭПС, выражающаяся в наборе специфических ферментов и других белков в мембранах и внутримембранной фазе ЭПС, но и существенная морфологическая дифференцировка всей системы гладкой ЭПС в клетках. По сравнению с шероховатой сетью гладкой ЭПС свойствен, пожалуй, более мультифункциональный характер.

Обе разновидности эндоплазматической сети могут выполнять изолирующую функцию — так, в некоторых случаях (простейшие, специализированные клетки многоклеточных животных) и шероховатая и гладкая ЭПС служат резервуаром для запасаания питательных веществ.

Эндоплазматическая сеть представляет собой один из наиболее лабильных органоидов клетки, обладающих способностью к различного рода перестройкам; такие перестройки сети удается наблюдать на культивируемых *in vitro* клетках с помощью микрокиносъемки.

При различных воздействиях на клетку в эндоплазматической сети происходят ярко выраженные морфологические изменения. Они могут заключаться в отрыве рибосом от поверхности цистерн шероховатой сети, образовании спиральных конгломератов из спавшихся мембран, набухании цистерн или трубочек и т. д. До определенной стадии эти изменения обратимы, что также свидетельствует о значительной лабильности данного органоида.

### 3.4.2. АППАРАТ ГОЛЬДЖИ

В отличие от эндоплазматической сети, которая стала объектом исследования относительно недавно, аппарат Гольджи (АГ) был открыт в конце прошлого века. Этому органоиду было посвящено большое количество работ описательного и экспериментального характера, выполненных с помощью обычных светооптических методов. Возможность обнаружения аппарата Гольджи на светооптическом уровне базируется на особом свойстве его мембранных структур. При определенных условиях они обладают способностью избирательно осаждать соли тяжелых металлов, в частности соли осмия. Благодаря этому уже в конце прошлого и начале нынешнего века были эмпирически разработаны и усовершенствованы методы, позволяющие выявлять аппарат Гольджи в различных эукариотных клетках. Большое значение для дальнейших исследований имела разработка биохимических методов выделения цистерн аппарата Гольджи; важную роль в изучении АГ сыграло использование электронной микроскопии в сочетании с методами автордиографии и цитохимии.



За полувековой период, предшествовавший современному этапу развития цитологии, при исследовании аппарата Гольджи было сделано много важных открытий. В частности, установили, что АГ имеется во всех разновидностях эукариотных клеток, его форма в разных клетках весьма разнообразна. Структура АГ изменяется при разных функциональных состояниях клетки и в процессе ее дифференцировки. Была установлена также важная роль аппарата Гольджи в процессе формирования секреторных гранул.

Однако детальное изучение тонкой функциональной морфологии этого органоида оказалось возможным лишь с использованием всего комплекса современных методов.

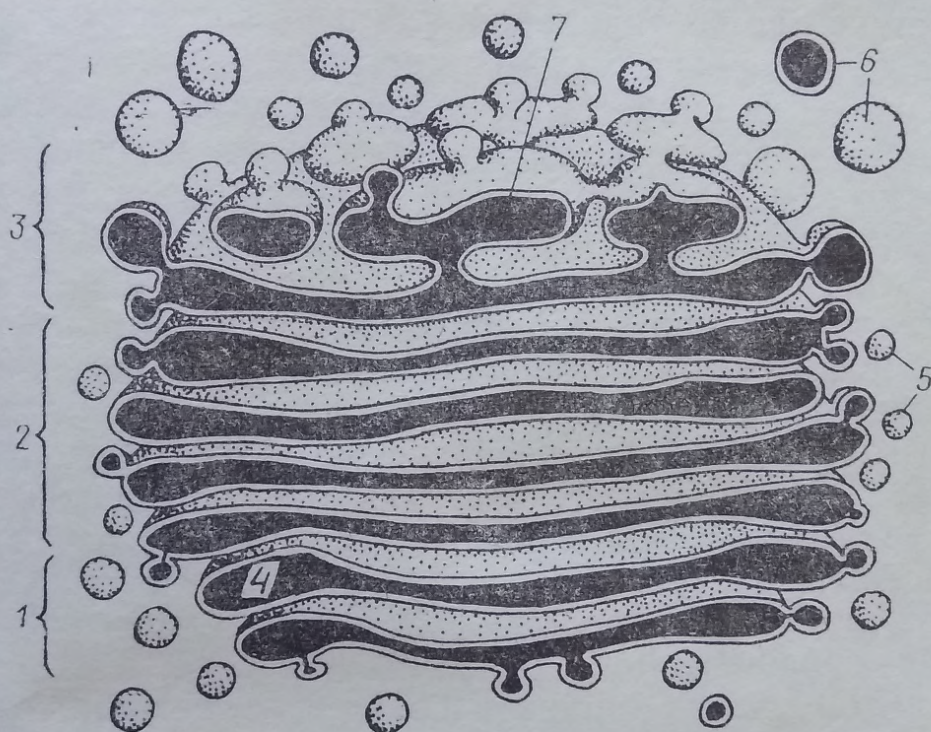


Рис. 51. Организация аппарата Гольджи.

1 — цис-, 2 — средняя и 3 — транс-части аппарата Гольджи; 4 — цистерны; 5 — транспортные и 6 — секреторные пузырьки; 7 — распределительный отдел транс-части аппарата Гольджи.

Аппарат Гольджи (рис. 51) — это особая часть метаболической системы цитоплазмы. В его состав входят цистерны, трубчатые структуры, различные вакуоли и транспортные пузырьки, содержимое этих мембранных компонентов и специальная зона гиалоплазмы — цитозоль АГ. В периферическом цитозоле расположены скопления полирибосом, синтезирующих ряд ферментов, специфических для мембран аппарата Гольджи.

Аппарат Гольджи может быть представлен в клетке одним, относительно крупным комплексом мембранных структур, находящимся в специальном участке гиалоплазмы. Однако чаще встречается целая система связанных между собой или изолированных комплексов, расположенных в разных участках цито-



плазмы. Они носят название диктиосом. Такая организация аппарата Гольджи наиболее типична для клеток, специализирующихся на выделении различных секреторных продуктов. Иногда в таких случаях комплексы Гольджи, расположенные в разных зонах цитоплазмы, отвечают за обработку и внутриклеточный транспорт разных соединений. Например, в клетках гиподермы членистоногих, в частности у насекомых в период линьки, диктиосомы, локализованные в апикальной, центральной и базальной частях цитоплазмы, специализированы на обработку разных синтезируемых или поглощаемых из гемолимфы веществ.

Центральная, наиболее типичная и постоянная структура аппарата Гольджи — это стопка прилегающих друг к другу уплощенных цистерн (рис. 51, 52, А). Эта система цистерн поляризована как по вертикальной, так и по горизонтальной оси — от центра к периферии каждой цистерны. Вертикальная поляризация часто выражается в наличии двух полюсов, иногда различающихся по морфологии. Раньше их именовали выпуклым и вогнутым, проксимальным и дистальным, регенераторным и секреторным. Сейчас более принято называть их соответственно цис- и транс-полюсами. Выделяют также и среднюю (или медиальную) часть АГ. На цис-полюсе комплекса Гольджи краевые цистерны обычно находятся в тесном контакте с эндоплазматической сетью; они уплощены и изогнуты таким образом, что их выпуклая поверхность обращена к ЭПС (рис. 52, Б, Ж). На транс-полюсе цистерны обычно расширены и заполнены секретом. Здесь иногда наблюдается непосредственный переход целых цистерн или их периферических участков в секреторные гранулы. Цистерны транс-полюса своей вогнутой поверхностью обращены к цитоплазме.

Цис- и транс-части аппарата Гольджи существенно различаются и по химическому составу. С помощью цитохимических методов показано, например, что кислая фосфатаза локализуется в транс-части и не обнаруживается в цис-части комплекса. Некоторые ферменты эндоплазматической сети, напротив, выявляются только в цис-части АГ. Теми же методами можно отчетливо продемонстрировать и дифференцировку цистерн по горизонтали. Так, в цис-цистернах ферменты ЭПС концентрируются в их периферических участках. Аденилатциклаза локализуется в расширенных концевых участках транс-цистерн и практически отсутствует в их центральной части. На периферии транс-цистерн часто наблюдается и клатриновое «опущение».

Один из примеров типичной организации аппарата Гольджи дают слизистые бокаловидные клетки кишечного эпителия млекопитающих (рис. 52, Б). Методом автордиографии на ультраструктурном уровне в них детально изучена динамика синтеза мукопротеидного секрета. Аппарат Гольджи в этих клетках занимает значительную область надъядерной цитоплазмы и представлен в основном одним крупным комплексом сильно изог-



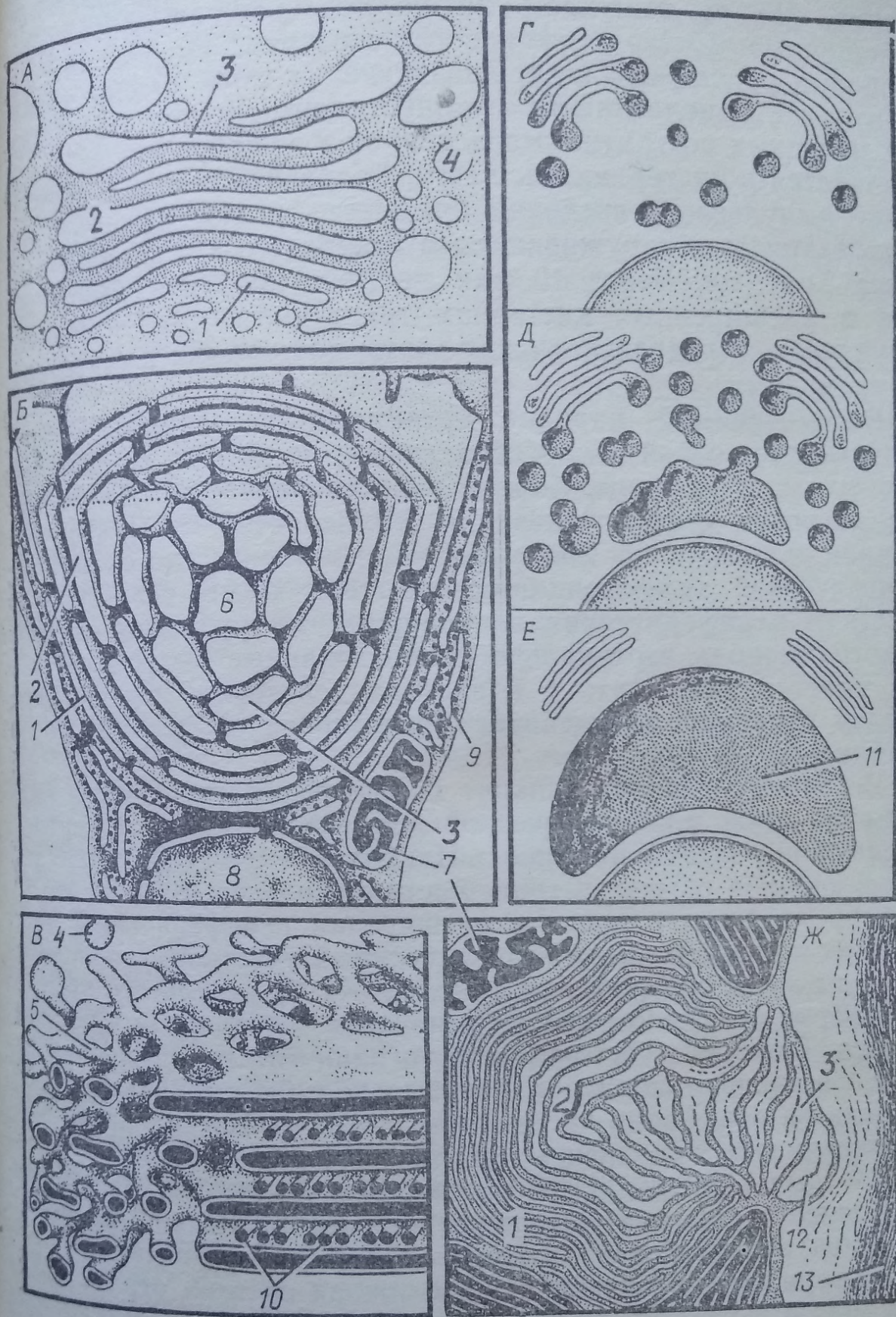


Рис. 52. Варианты организации аппарата Гольджи в клетках высших растений (А), многоклеточных животных (Б, В), в сперматозоидах при формировании акросомы (Г—Е) и у одноклеточной водоросли (Ж).

1 — цистерны; 2 — средняя и 3 — транс-части аппарата Гольджи; 4 — периферические пузырьки; 5 — тубулярные мембранные структуры; 6 — секреторные гранулы; 7 — митохондрии; 8 — ядро; 9 — ЭПС; 10 — фибриллярные структуры между цистернами; 11 — акросома; 12 — секреторные компоненты клеточной стенки; 13 — клеточная стенка.



нутых цистерн; эта система морфологически отчетливо поляризована. На ее выпуклом цис-полюсе располагаются сильно уплощенные цистерны. На вогнутом транс-полюсе цистерны, наоборот, расширены и хорошо видна их связь с секреторными гранулами, заполненными мукопротеидным секретом. Включение меченных по тритию моносахаров в мукопротеидный секрет начинается в цистернах цис-части. В дальнейшем (через 20 мин после импульсного введения предшественника) меченые мукополисахариды обнаруживаются в центральных цистернах комплекса Гольджи. Через 40 мин меченые продукты выявляются уже в расширенных цистернах транс-части и в мембранных структурах, переходных между этими цистернами и секреторными гранулами.

Рассмотренный вариант организации аппарата Гольджи представляет собой распространенную, но далеко не единственную его модификацию. Характерной особенностью такого «цистернального» типа организации АГ является его резко выраженная вертикальная поляриность при относительно слабой морфологической дифференцировке цистерн по горизонтали и отсутствии периферических вакуолярных и трубчатых структур. Такого же рода вертикально поляризованные аппараты Гольджи удастся наблюдать и в клетках некоторых морских водорослей в период интенсивного формирования ими клеточной стенки (рис. 52, Ж).

Во многих случаях аппарат Гольджи характеризуется наличием сложной морфологической дифференцировки от центра к периферии каждой цистерны. Наиболее выражена такая дифференцировка обычно в транс-части комплекса. Внешне это может проявляться в простом расширении периферической части цистерн и отшнуровывании расширенных участков, заполненных тем или иным содержимым (рис. 52, А). В результате этого по периферии стопки цистерн формируется вакуолярная часть комплекса Гольджи, состоящая из ограниченных мембраной пузырьков разных размеров («пузырьковый» тип организации). Иногда на периферии цистерн наблюдается формирование своеобразных пор, заполненных цитозолем, содержащим электронно-плотные гранулы и палочковидные структуры, напоминающие внешне поровые комплексы ядерной оболочки (см. ниже). Наконец, в еще более сложных вариантах организации АГ на периферии цистерн развивается сложная система ограниченных мембранами переплетающихся трубчатых структур, от которых и отшнуровываются пузырьки и вакуоли. При этом цистерны могут редуцироваться до относительно небольших по диаметру образований (рис. 52, В).

В описываемых модификациях аппарата Гольджи помимо внешних морфологических могут наблюдаться и существенные различия в химическом составе содержимого цистерн и периферических структур, а также их мембранных компонентов и при-



мембранных слоев. Наряду с этим в данных случаях выражена и гетерогенность комплекса по вертикали. В клетках с комплексами Гольджи такого типа секрет по мере формирования перемещается из центральной части цистерн в периферические отдели с последующим их превращением в вакуоли, из которых и образуются секреторные гранулы. Бывают и специализированные клетки, где белковая часть секрета вообще не попадает в цистерны АГ, а прямо из ЭПС при помощи транспортных пузырьков поступает в так называемые конденсационные вакуоли (см. ниже). Последние представляют собой крупные, ограниченные мембраной образования, расположенные по периферии цистерн аппарата Гольджи.

В рассматриваемых вариантах организации АГ, характерных для секреторных клеток, иногда встречаются специальные связующие структуры, расположенные в около- и межцистернальном цитозоле. К ним относятся упомянутые выше гранулы и фибриллы в периферических порах цистерн. Между центральными частями цистерн может находиться электронно-плотный матрикс, формирующий конусовидные или овальные образования. Иногда в межцистернальном цитозоле удается обнаружить упорядоченно расположенные фибриллы (рис. 52, В). Роль всех этих структур пока не ясна, возможно, они выполняют стабилизирующую функцию.

Между описанными типами организации аппарата Гольджи («цистернальным» и «пузырьковым») существуют и многочисленные промежуточные формы.

Как было сказано выше, одной из функций АГ является накопление секретируемых продуктов. Они попадают в аппарат Гольджи из ЭПС с помощью так называемых транспортных пузырьков.

Во многих клетках наблюдается отшнуровывание от периферических цистерн ЭПС мелких пузырьков, которые играют роль специальной системы внутриклеточного переноса синтезируемых на прикрепленных рибосомах компонентов секрета. Благодаря сходству мембран цис-части аппарата Гольджи и ЭПС эти транспортные пузырьки могут сливаться с мембранами цистерн, выделяя в них белковые компоненты мукопротеидного секрета. В некоторых секреторных клетках транспортные пузырьки, освободившиеся от своего содержимого, могут отшнуровываться от АГ и возвращаться в ЭПС за новой порцией белка. У таких секреторных клеток в участке цитозоля, пограничном между ЭПС и АГ, обнаруживаются особые электронно-плотные структуры, обеспечивающие, по мнению ряда исследователей, направленное перемещение этих транспортных пузырьков.

В цистернах и вакуолях аппарата Гольджи может происходить конденсация накапливаемых секреторных продуктов. На экзокриновых клетках поджелудочной железы показано, что этот процесс энергонезависим, т. е. не требует АТФ, и часто проис-



ходит путем образования осмотически неактивных агрегатов. Это могут быть либо кристаллы, либо агрегаты с противоположно заряженными молекулами (белок-полисахаридные комплексы, катионные белки, глюкозамингликаны и гликопротеиды). Таким образом, сущность конденсации сводится к образованию нерастворимых соединений. Процессы конденсации продукта в разных секреторных клетках могут быть выражены в разной степени даже при синтезе однородных соединений. Так, в одонтоблестах, секретирующих коллаген, образование в АГ компактных секреторных гранул удается отчетливо выявить только методами электронной автордиографии. В фиброблестах и остеоблестах, синтезирующих и выделяющих тот же коллаген, таких гранул обнаружить не удастся. Не выражены процессы конденсации на заключительных этапах сборки сложных молекул иммуноглобулинов и в аппарате Гольджи иммунцитов.

В аппарате Гольджи происходит посттрансляционная обработка белка. Она может включать такие этапы, как протеолитическое расщепление белков, их сульфатирование, присоединение фосфорных остатков, закономерные преобразования углеводных компонентов белковых молекул (гликозилирование) и целый ряд других важных процессов. Все это позволяет рассматривать аппарат Гольджи как интегрирующую метаболическую систему клетки, обеспечивающую кооперативный синтез сложных соединений.

В последнее время на ряде модельных объектов получены данные, существенно расширившие наши представления о роли аппарата Гольджи в обработке основных потоков синтезируемых клеткой белков (секреторных, мембранных, лизосомальных) и о том, какие конкретные изменения происходят с этими соединениями.

Одной из основных функций аппарата Гольджи является сортировка поступающих в него новосинтезированных мембранных и секреторных белков и лизосомальных ферментов. Эта функция может осуществляться клеткой как тремя различными путями, так и комбинацией их. Одним из путей такой сортировки может быть территориальное разделение отдельных диктиосом аппарата Гольджи с прилегающими к ним участками шероховатой ЭПС и специализацией их на синтез и обработку разных секретруемых соединений. Это характерно для полиплоидных секреторных клеток слюнной железы некоторых насекомых и, по-видимому, может иметь место и у других объектов.

У нейтрофильных лейкоцитов млекопитающих проблема сегрегации секрета, синтезируемого в шероховатой ЭПС, и сосредоточения его в гранулах двух типов решается путем разграничения во времени двух «волн» синтеза секрета. Обработка белков и формирование гранул происходят в одних и тех же цис-



тернах аппарата Гольджи, но последовательно, в два этапа, соответственно двум «волнам» синтеза этих продуктов.

Наконец, наиболее универсальным механизмом сортировки, свойственным, по-видимому, большинству клеток, является гликозилирование белков, попадающих в цистерны аппарата Гольджи. Впервые на существование этого процесса указал в середине шестидесятых годов К. Леблон на основании автордиографических исследований секреторных бокаловидных клеток. Однако фракции более-менее «чистых» цистерн Гольджи для биохимических исследований смогли выделить относительно недавно. Лишь после этого удалось выявить «маркерные» ферменты, локализованные в цистернах АГ и обеспечивающие закономерное гликозилирование белков.

В настоящее время последовательные этапы этого процесса представляются следующим образом. Как было показано выше, большинство белков, оказавшихся в цистернах ЭПС, сразу же подвергаются котрансляционному гликозилированию: к их аспарагиновому остатку присоединяется полисахарид, содержащий маннозные и глюкозные остатки (рис. 47, 48). Глюкоза и один маннозный остаток удаляются еще в ЭПС до перехода образовавшегося гликопротеида в аппарат Гольджи.

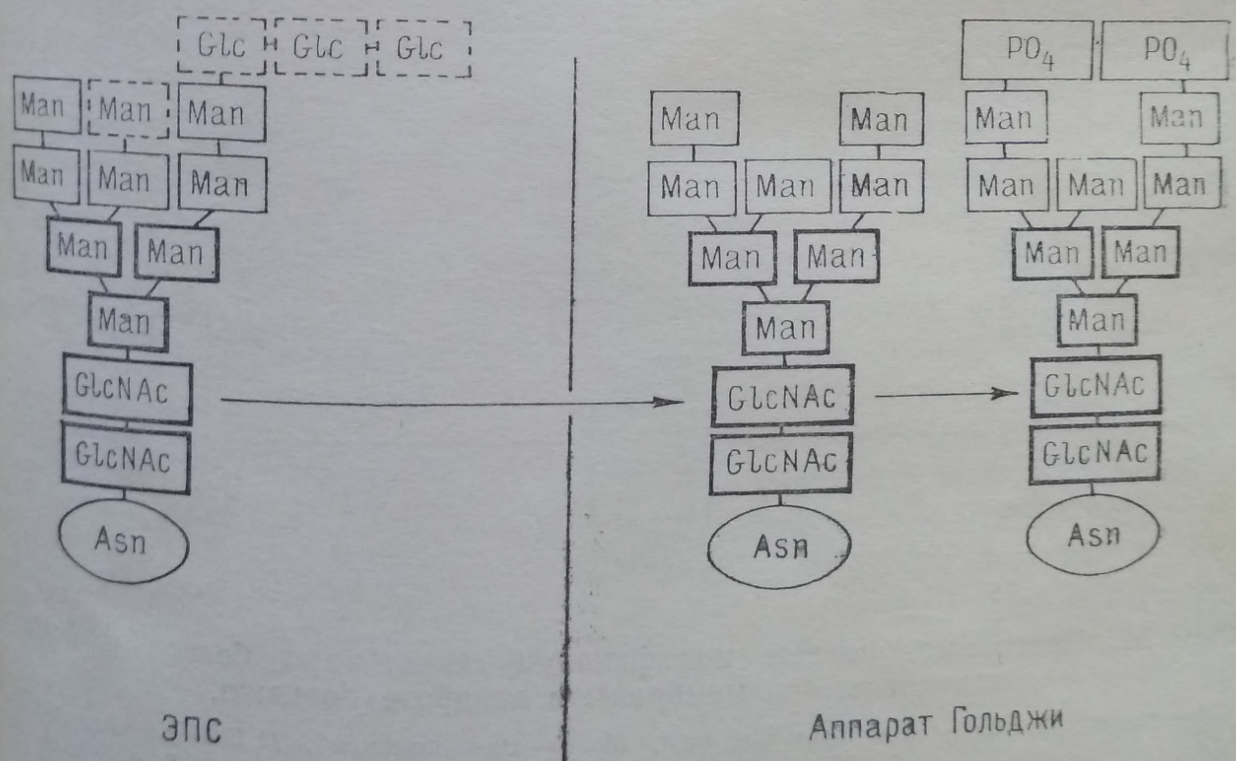


Рис. 53. Посттрансляционные модификации лизосомальных ферментов.  
Обозначения как на рис. 48.

Судьба гликопротеида, поступившего в комплекс Гольджи, может быть двойкой. Если это лизосомальный фермент, то к его маннозному остатку присоединяется фосфорная группа образуя в составе гликопротеида маннозо-6-фосфат (рис. 53).



Затем этот гликопротеид без дальнейших изменений проходит через АГ и направляется в лизосомы (подробнее см. ниже). Если же поступивший из ЭПС в комплекс Гольджи гликопротеид является секреторным или мембранным белком, то он подвергается закономерным превращениям. Их суть состоит в поэтапном удалении нескольких маннозных остатков (кроме тех трех, которые входят в состав постоянного «пятичленного ко-ра») с помощью ферментов маннозидазы I и II и последовательном присоединении N-ацетилглюкозамина, галактозы и сиаловых кислот с помощью соответствующих гликозилтрансфераз — N-ацетилглюкозаминтрансферазы, галактозилтрансферазы и трансферазы сиаловых кислот (рис. 54). В этом процессе принимают участие УДФ и ЦМФ.

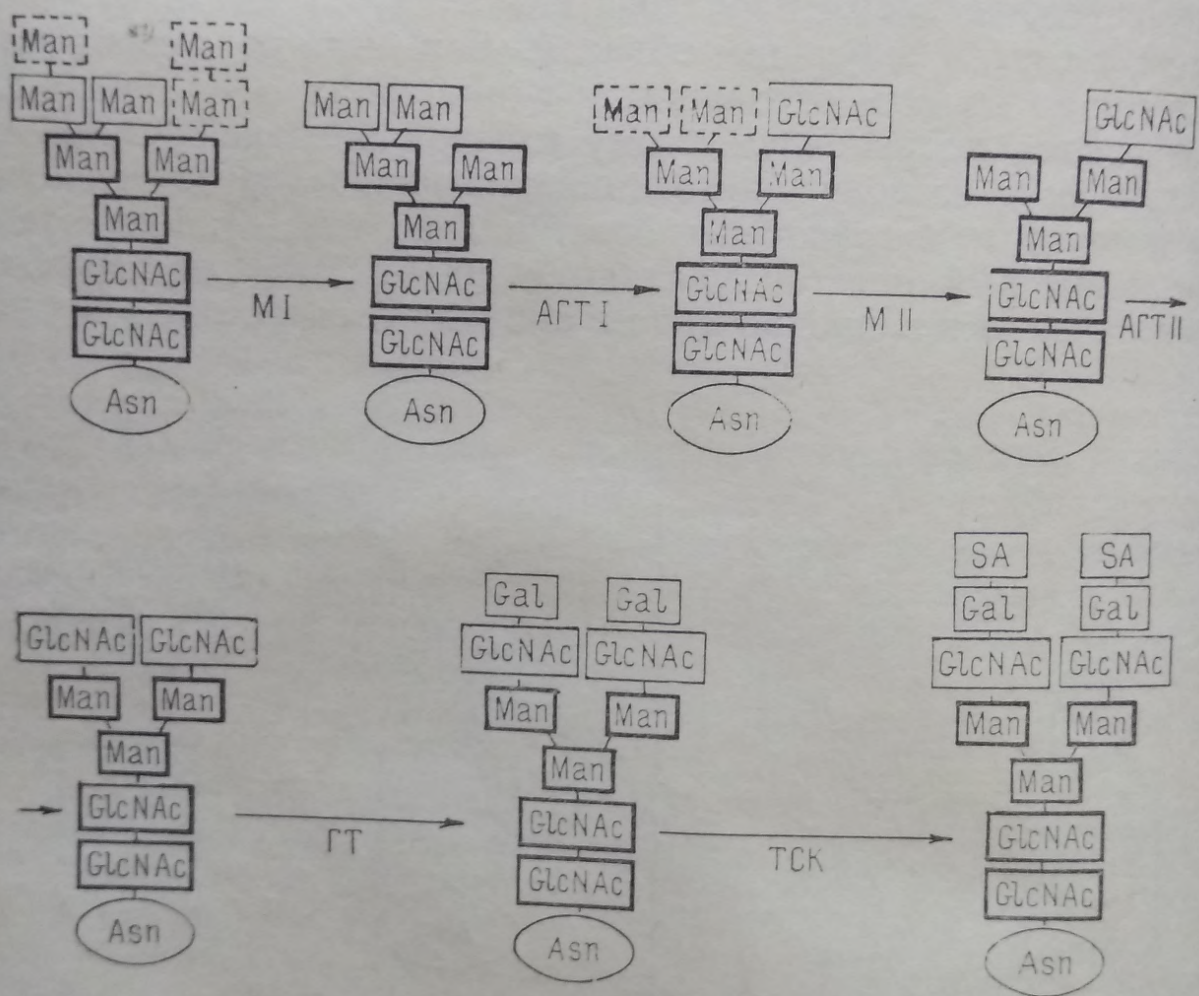


Рис. 54. Посттрансляционные модификации секреторных белков и белков плазматической мембраны в аппарате Гольджи.

Gal — галактоза, SA — сиаловые кислоты, M I — маннозидаза I, M II — маннозидаза II, AGT I — ацетилглюкозаминтрансфераза I, AGT II — N-ацетилглюкозаминтрансфераза II, GT — галактозилтрансфераза, TCK — трансферазы сиаловых кислот. Пунктирной линией обозначены остатки сахаров, удаляемых на разных этапах процессинга. Остальные обозначения как на рис. 48.

Количество и состав олигосахаридных цепей гликопротеида могут варьировать в зависимости от типа клеток (на рисунках приведены две углеводные цепи, однако не менее часто встречаются гликопротеиды, содержащие три цепи; одна из них может состоять только из маннозных остатков, а остальные — из



вышеперечисленных олигосахаридов). Таким образом, синтезированные на прикрепленных рибосомах белки поступают в аппарат Гольджи и подвергаются в нем закономерным превращениям — процессингу.

Существенный интерес представляет вопрос о том, где же конкретно локализованы последовательные этапы процессинга. Это было выяснено с помощью дифференциального центрифугирования цистерн аппарата Гольджи в градиенте плотности. При этом выделяются три фракции с разной степенью плотности; ферменты, отвечающие за разные этапы процессинга, сосредоточены в разных фракциях.

Фракции с наибольшей плотностью содержали ферменты, присоединяющие фосфатные группы. Во фракции с промежуточной плотностью находились ферменты, удаляющие маннозу (маннозидазы I и II) и присоединяющие N-ацетилглюкозамин (N-ацетилглюкозаминтрансферазы). Наконец, во фракции с наименьшей плотностью были сосредоточены ферменты, присоединяющие галактозу (галактозилтрансферазы) и остатки сиаловых кислот (трансферазы сиаловых кислот). Эти данные были подтверждены опытами на культивируемых клетках линии СНО (клетках яичника китайского хомячка), зараженных вирусом везикулярного стоматита. Белковая оболочка этого вируса содержит так называемые G-белки; если заразить этим вирусом какую-либо клетку, то ее метаболический аппарат начинает продуцировать практически только G-белки вируса. Анализ этих белков из цистерн аппарата Гольджи зараженных клеток показал, что G-белки с удаленными первыми остатками маннозы находятся в более плотной мембранной фракции, содержащей фермент маннозидазу I. G-белки, связанные с галактозой, оказались в более легких мембранных фракциях.

Затем эти биохимические данные были соотнесены с морфологической структурой аппарата Гольджи с помощью методов иммуноцитохимии; выделив из цистерн аппарата Гольджи чистый фермент N-ацетилглюкозаминтрансферазу и получив на него моноклональные антитела, ими обработали срезы аппарата Гольджи. Это однозначно подтвердило наличие фермента лишь в двух-трех средних (медиальных) цистернах аппарата Гольджи. Позднее этим же методом удалось определить локализацию и других ферментов (см. рис. 62). Маннозидазы I и II также располагаются в медиальной части комплекса. Галактозилтрансфераза и трансферазы сиаловых кислот локализуются исключительно в транс-цистернах комплекса Гольджи. В цис-цистернах АГ сосредоточены ферменты, присоединяющие к лизосомальным белкам фосфатные группы.

Таким образом, можно заключить, что стопки цистерн Гольджи неоднородны. Они представляют собой специализированные компартменты, отличающиеся и по набору ферментов и по происходящим в них химическим реакциям.



Особую роль в функционировании аппарата Гольджи играет собственно сортировочный компартмент, или так называемый транс-распределительный отдел (распределительный отдел транс-части) комплекса — периферическая (по вертикали) часть транс-цистерн. В этом компартменте, по-видимому, имеет место окончательное разделение трех потоков веществ — секреторных белков, мембранных и лизосомальных ферментов (см. ниже и рис. 64).

На примере многих клеток в настоящее время показано, что характерный для надмембранной части поверхностного аппарата углеводный ансамбль, определяющий специфику данной клетки, формируется в пузырьках аппарата Гольджи и уже в готовом виде встраивается в систему поверхностного аппарата. Таким образом, именно через аппарат Гольджи может в конечном счете регулироваться состояние основной рецепторной системы клеток. В то же время наблюдаются не менее тесные взаимоотношения аппарата Гольджи с мембранами ЭПС и ядерной оболочки, что обуславливает возможность опосредованного или прямого генетического контроля за его синтетической деятельностью.

Аппарат Гольджи является органоидом, в котором протекают ключевые звенья анаболических процессов, но этим не исчерпывается его исключительно важная роль в жизнедеятельности клетки. Функционирование АГ обеспечивает и нормальное протекание катаболических процессов, поскольку он принимает непосредственное участие в образовании лизосом.

Как указывалось выше, в аппарате Гольджи проходят посттрансляционную обработку лизосомальные ферменты — гидролазы. Кроме того, он может тем или иным образом участвовать и в их структурной упаковке, т. е. образовании мукополисахаридного матрикса и мембран первичных лизосом. Основная часть этих процессов у некоторых клеток может осуществляться в специализированном отделе ЭПС, непосредственно связанном с АГ. В других клетках для этой цели используются отдельные цистерны аппарата Гольджи, по периферии которых и формируются первичные лизосомы. В случае узкой специализации, как, например, при образовании гигантской лизосомы сперматозоидов (акросомы), деятельность аппарата Гольджи целиком направлена на образование этой структуры (рис. 52, Г—Е).

Участие аппарата Гольджи в катаболических процессах иногда не ограничивается образованием лизосом. Например, в клетках жирового тела насекомых за счет пузырьков АГ формируется мембрана аутофагической вакуоли, на первых этапах процесса не содержащей лизосомных гидролаз (см. ниже).

Итак, аппарат Гольджи — универсальный органоид эукариотных клеток, играющий важнейшую роль в организации внутриклеточного метаболизма. Функция его в клетках разных типов может проявляться не одинаково, что и обуславливает



большое разнообразие морфофункциональной организации этого органоида. Однако, несмотря на многочисленные модификации комплекса Гольджи, его общее функциональное значение и взаимосвязь с другими системами метаболического аппарата цитоплазмы, а также с поверхностным и ядерным аппаратами основаны на общих для всех клеток принципах. Этот органоид, в частности, обеспечивает заключительные этапы формирования и созревания всех секретируемых клеткой продуктов, ферментов лизосом, а также белков и гликопротеидов плазматической мембраны поверхностного аппарата клетки.

### 3.4.3. ЛИЗОСОМЫ

Лизосомы — это мелкие пузырьки, ограниченные мембраной и содержащие набор гидролитических ферментов, основная функция которых — осуществление внутриклеточного пищеварения.

В отличие от ЭПС и митохондрий — органоидов, которые характеризуются активной компартментализацией, связанной с векторной структурной организацией метаболических процессов, — лизосомам свойственна так называемая пассивная компартментализация. Она заключается в необходимости временной изоляции, выключения из метаболизма гидролитических ферментов, что и достигается путем формирования мембранных везикул, содержащих гидролазы. Барьерная роль мембран лизосом дополняется разнообразными механизмами инактивации ферментов. Около 20% ферментов лизосом встроено в мембрану и временно инактивировано в ней благодаря связям с липидами. Остальная часть ферментов (около 80%) не связана с мембраной и находится в мукополисахаридном матриксе лизосом. Их инактивация, по-видимому, обеспечивается углеводными компонентами, входящими в состав молекул большинства ферментов (рис. 55), а также сложными мукополисахаридами типа глюкозамингликанов, имеющимися в матриксе лизосом. Определенную роль в инактивации лизосомальных ферментов играет кислая среда, которая поддерживается в лизосомах (рН 5).

В изучении механизмов регуляции рН среды в лизосомах достигнуты определенные успехи. Относительно давно был разработан простой и надежный метод определения величины рН вakuолярных структур с помощью липофильных слабых оснований. Они проникают через мембраны, будучи незаряженными при нейтральных значениях рН, и аккумулируются в пузырьках с низким рН, в тем бóльших количествах, чем ниже рН. Хорошие результаты дает применение в подобных исследованиях прижизненной окраски акридин-оранжем, поскольку при изменении его концентрации меняется интенсивность флюоресценции. Анализ с использованием липофильных оснований можно



проводить и на светооптическом, и на электронно-микроскопическом уровнях. В последнем случае в качестве маркеров можно использовать меченые антитела. Ответственной за поддержание кислой среды в лизосомах является вакуолярная  $H^+$ -АТФаза — одна из разновидностей протонных помп.

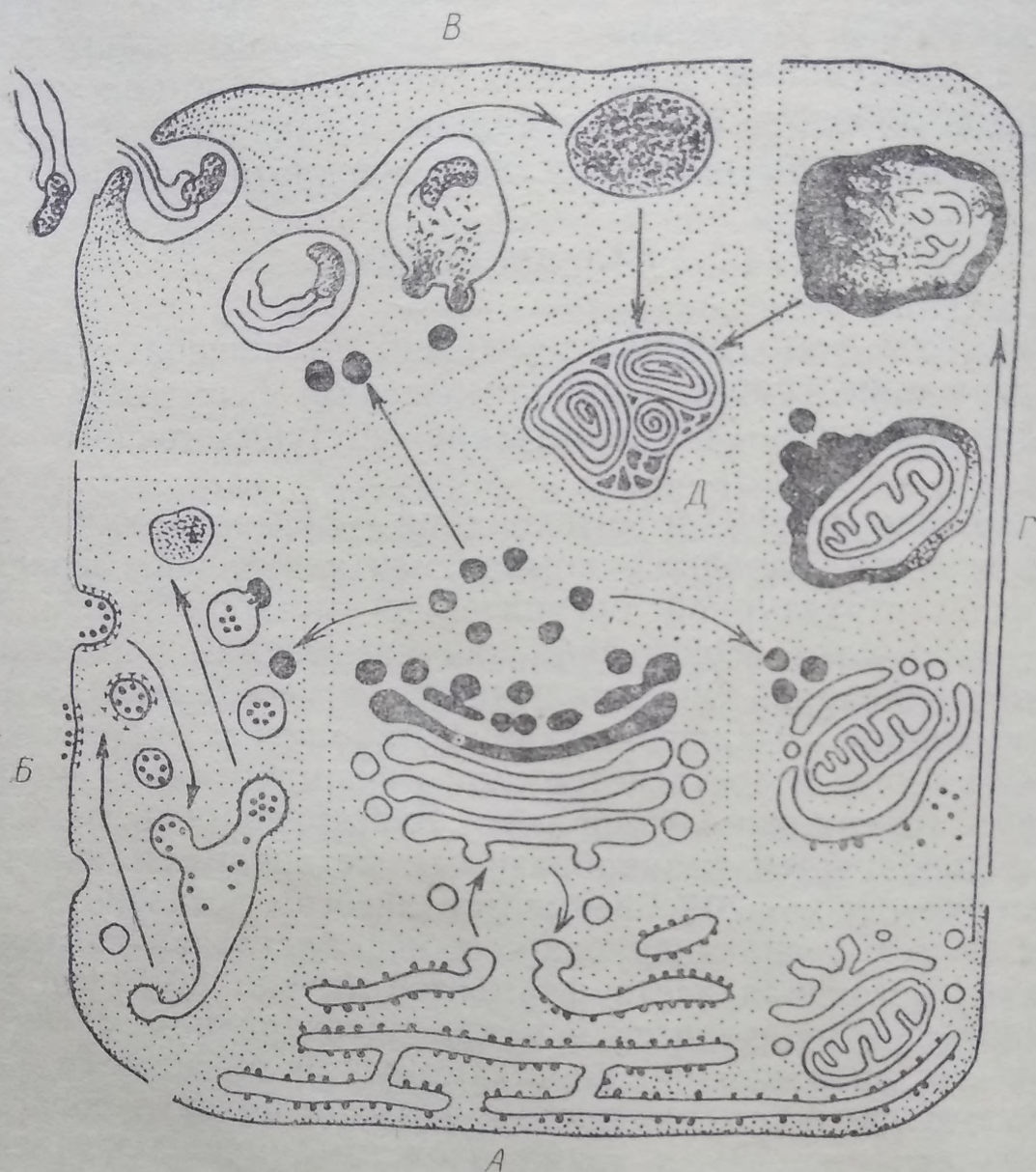


Рис. 55. Образование и функционирование лизосом.

А — синтез лизосомальных ферментов и образование лизосом; Б—Г — участие лизосом в опосредованном рецепторами эндоцитозе (Б), гетерофагии (фагоцитоз бактерий, В) и автофагии (Г); Д — образование остаточного тельца (телолизосомы).

Вакуолярная  $H^+$ -АТФаза в эукариотных клетках локализована в мембранах лизосом, рецептосом, окаймленных пузырьков, вакуолей аппарата Гольджи и некоторых других образований вакуолярной системы. Она состоит из нескольких полипептидных цепей. Вакуолярные  $H^+$ -АТФазы, по-видимому, электрогенны (нет сопряженного переноса других ионов), т. е. закисление происходит с генерированием мембранного потенциала (рис. 56).

Сложность организации мембран лизосом заключается в том, что их барьерная изолирующая функция носит относитель-



ный характер, т. е. при определенных условиях они способны и пропускать внутрь высокомолекулярные соединения и обеспечивать регулируемый выход в цитоплазму гидролитических ферментов. Благодаря этим свойствам лизосомных мембран, по-видимому, могут частично создаваться условия для реализации катаболических процессов на молекулярном и надмолекулярном уровнях, а также для осуществления регуляторной функции лизосомальных гидролаз (см. ниже).

Лизосомы содержат ферменты, способные разрушить практически все природные полимерные органические соединения. В настоящее время в лизосомах выявлено около 40 гидролаз. Количественные соотношения гидролаз широко варьируют в лизосомах разных клеток одного многоклеточного организма и в клетках разных организмов. Качественный состав ферментов не одинаков в специализированных лизосомах разных клеток. Он может варьировать и в лизосомах одной клетки. Большинство ферментов лизосом представлено несколькими родственными формами, отличающимися рядом физико-химических признаков.

Находясь в инактивированном состоянии, ферменты лизосом тем не менее обладают способностью быстро активироваться, т. е. лизосомы должны иметь механизмы, обеспечивающие им немедленный переход к активной деятельности. Они должны быть снабжены развитым рецепторным аппаратом, уметь перемещаться в клетке и, наконец, их мембраны должны иметь способность к локальному разрушению при контакте с фагосомами. О конкретных деталях этих механизмов известно немного. Так, в процессах перемещения лизосом в клетке принимают участие микротрубочки, поскольку при их разрушении специфическими ингибиторами перемещение лизосом прекращается.

Лизосомы играют важную роль в процессах гетерофагии. После слияния первичных лизосом с фагосомой и образования фаголизосомы происходит активация гидролаз и они переваривают содержимое фаголизосомы. Продукты гидролиза поступают в гиалоплазму, а фаголизосома превращается во вторичную

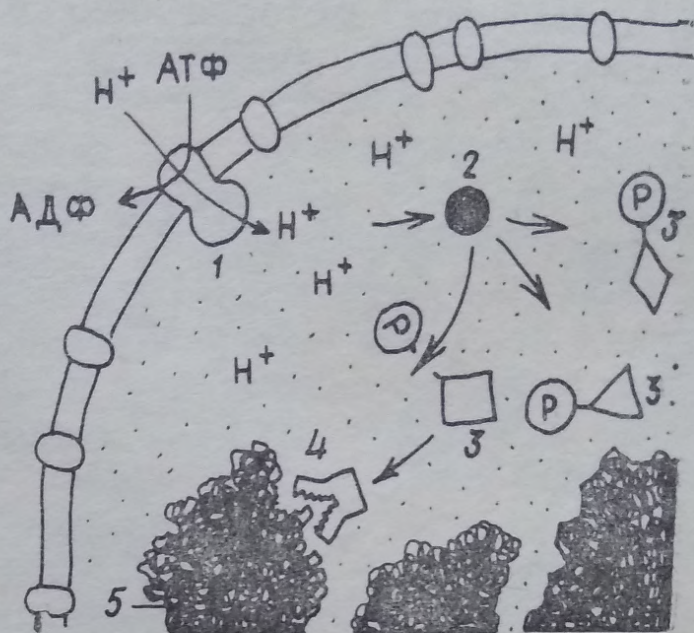


Рис. 56. Работа ферментов лизосомы.

1 — вакуолярная  $H^+$ -АТФаза; 2 — кислая фосфатаза; 3, 4 — гидролитические ферменты в неактивной форме (3) и активированные дефосфорилированием (4); 5 — субстрат.



лизосому, которая может вступить в контакт с другой фагосомой и обеспечить гидролиз поглощенных ею частиц. После того, как вторичная лизосома проделает несколько таких циклов, в ней может накопиться большое количество непереваренных остатков, и она превращается в так называемое остаточное тело, или телоллизому, которая либо сохраняется в клетке, либо удаляется из нее путем экзоцитоза.

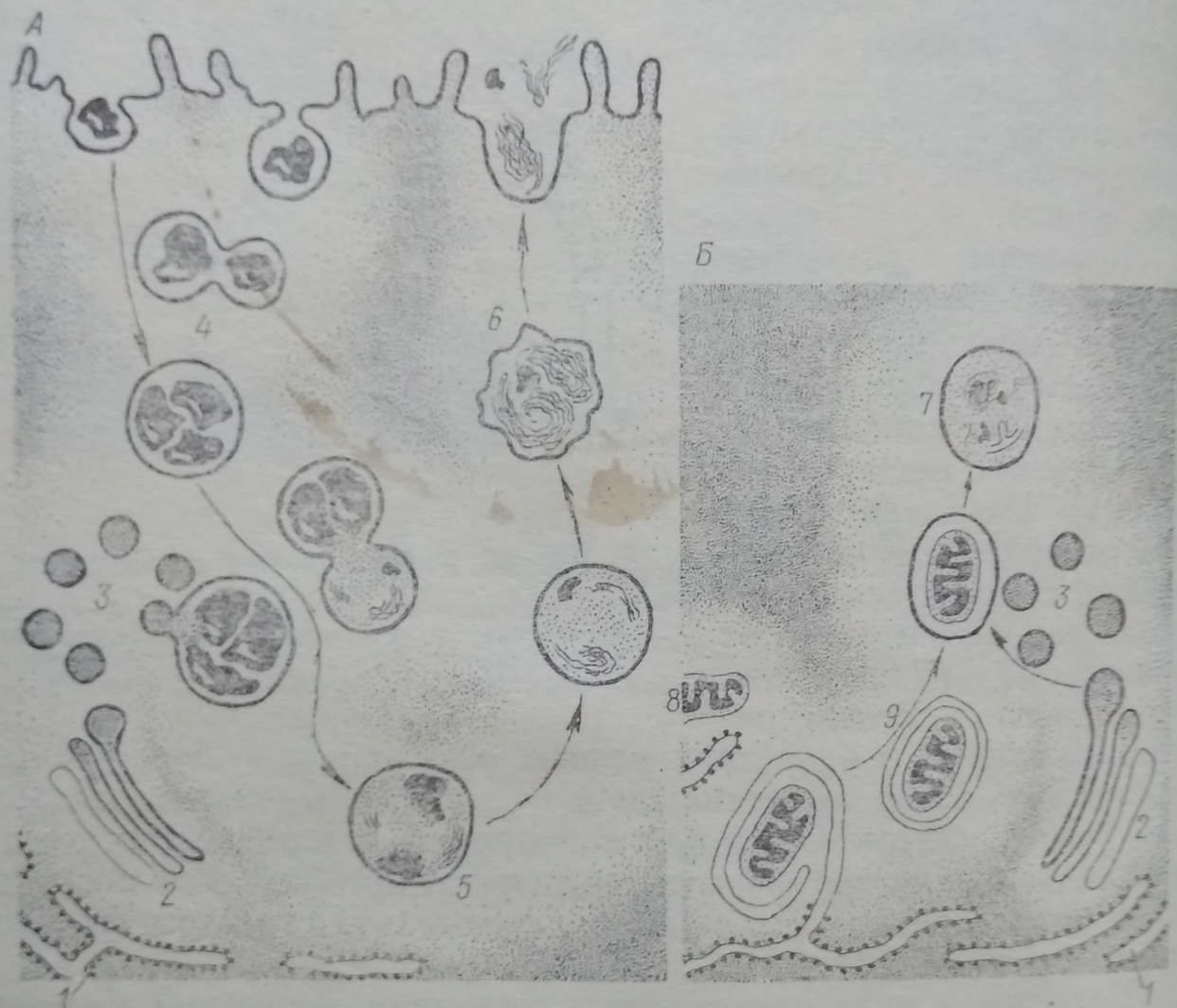


Рис. 57. Работа лизосом в клетках проксимального отдела нефрона.

А — гетеро- и Б — аутофагические циклы. 1 — ЭПС; 2 — аппарат Гольджи; 3 — первичная лизосома; 4 — фагосома; 5 — вторичная лизосома; 6, 7 — остаточное тельце; 8 — митохондрия; 9 — образование мембраны аутофагической вакуоли.

Описанный выше так называемый гетерофагический цикл лизосом (рис. 57, А) был известен в принципе еще в конце прошлого и в начале нынешнего веков благодаря исследованиям И. М. Мечникова и его последователей, изучавших процессы фагоцитоза и внутриклеточного пищеварения. Однако современный этап в развитии учения о лизосомах как об универсальных органоидах эукариотной клетки исчисляется с конца 40-х — начала 50-х годов, когда бельгийскому биохимику К. де Дюву удалось обнаружить, что при длительном хранении гомо-



гената гепатоцитов печени резко повышается активность кислой фосфатазы, содержащейся в этих препаратах. В результате специального исследования было высказано предположение о том, что «латентность» кислой фосфатазы обусловлена наличием изолирующей мембраны, которая разрушается при длительном хранении препаратов. По сути дела, эта идея предполагала существование в клетках особых органоидов, способных обеспечить катаболические процессы в нужном месте и в нужное время. Это блестяще подтвердилось при исследовании выделенных фракций под электронным микроскопом. Серия таких работ и положила начало развитию учения о лизосомах.

По современным представлениям лизосомный аппарат клеток эукариот развился как специализированная часть катаболической системы цитоплазмы. В определенном смысле аналогом лизосомного аппарата может служить мощный комплекс гидролитических ферментов, работающих в периплазматическом пространстве прокариотных клеток, т. е. как бы во внеклеточной среде. Благодаря деятельности этой системы многие прокариотные клетки обеспечивают потребности своего пластического и энергетического обмена.

Помимо гидролитических ферментов, деятельность которых протекает во внеклеточном примембранном пространстве, в стенке бактериальных клеток имеется сложная система латентных гидролаз, осуществляющих разрушение стенки при делении клеток (см. выше) и в функциональном отношении аналогичных лизосомному аппарату. Подобное приспособление есть и в стенке клеток высших растений (латентные формы гидролаз, активируемых изменением рН среды при работе протонных насосов под действием ауксина). Внеклеточная работа компартментализованных в клетках гидролаз — явление, широко распространенное и при разнообразной специализации клеток многоклеточных животных. На основе этой специализации развиваются такие важные процессы, как полостное пищеварение, оплодотворение, линька у насекомых и перестройка скелетных внеклеточных структур позвоночных животных. Все это вторичные приспособления катаболических систем эукариотных клеток, хотя они и имеют глубокую аналогию с теми первичными отношениями, которые наблюдаются у прокариот.

Внеклеточная работа компартментализированных гидролаз является, однако, лишь одним из вариантов вторичных приспособлений лизосомного аппарата эукариотных клеток. Основная и первичная функция лизосом — это их участие в гетерофагических и аутофагических циклах. Гетерофагические циклы в эволюции появились на основе внутриклеточного пищеварения (главного способа питания первичных одноклеточных эукариотных организмов). С возникновением многоклеточных организмов гетерофагические циклы вначале сохранялись у всех клеток, а затем в связи с их специализацией закрепились



во внутриклеточном варианте для реализации некоторых функций, в том числе пищеварительной — у хоаноцитов губок, в клетках пищеварительной паренхимы бескишечных турбеллярий и в клетках кишечного эпителия ряда форм (кишечнополостные, ресничные черви, моллюски), приобретших полостное пищеварение.

В эволюции многоклеточных организмов гетерофагическая функция лизосом используется не только в специализированных пищеварительных клетках кишечного эпителия. Еще на ранних этапах эволюции способность лизосом к гетерофагии легла в основу дифференцировки древней защитной системы — свободных клеточных элементов первичной паренхимы, обладающих мощно развитым лизосомным аппаратом. У современных животных защитные функции осуществляются уже сложной системой специализированных фагоцитов.

Наибольшей сложности такая система достигает у позвоночных животных, где ее составляют клеточные элементы двух типов: микро- и макрофаги. Первый тип фагоцитов — микрофаги — это клетки с множеством полностью сформированных первичных лизосом, которые представлены несколькими разновидностями. Помимо способности участвовать в гетерофагическом цикле лизосомный аппарат микрофагов обладает совершенными и сложными механизмами для внеклеточной работы лизосомных гидролаз. Лизосомы, расположенные в периферических слоях цитоплазмы, выводятся из клеток путем отщипывания таких участков цитоплазмы. В этом процессе участвует актин-миозиновая фибриллярная система. Лизосомы, расположенные в околоядерных участках цитоплазмы, выводятся при помощи микротрубочек. Второй тип фагоцитов — макрофаги — в неактивированном состоянии содержат сравнительно немного лизосом. Однако при активации эти клетки приобретают способность к формированию большого количества лизосом благодаря интенсивной деятельности их белоксинтезирующего аппарата. У высших позвоночных лизосомный аппарат таких клеток может не только осуществлять обычные гетерофагические функции, но и участвовать в тонкой гидролитической обработке чужеродных веществ, что повышает их антигенные свойства. Таким образом, лизосомы макрофагов оказываются вовлеченными и в реализацию адаптивного иммунитета.

Одной из специализированных и широко распространенных разновидностей лизосом, связанных с реализацией защитной функции, являются лизосомы гранулярных амебоцитов беспозвоночных животных, обеспечивающие свертывание гемолимфы. Они представлены у разных животных в разных вариантах. Так, у приапулид и мечехвоста в гранулах — специализированных лизосомах амебоцитов — содержится лишь способный к полимеризации белок и полимеризующий его фермент. При раздражении соответствующих рецепторов происходит экзоцитоз гра-



нул, их содержимое выделяется наружу, где после активации фермента и протекает полимеризация белка.

У мечехвоста помимо этой защитной системы гранулярные амебоциты содержат и обычные лизосомы. При попадании в полость тела животного фирмикутных бактерий происходит их фагоцитирование и уничтожение при помощи этого лизосомного аппарата. Специализированная лизосомальная система включается при заражении грациликутными бактериями, так как в мембране гранулярных амебоцитов мечехвоста имеются рецепторы к бактериальным эндотоксинам—липополисахаридам клеточной стенки грациликутных бактерий. При этом происходит дегрануляция и внеклеточная полимеризация содержащихся в гранулах белков.

У насекомых, кишечнополостных, асцидий и иглокожих в гранулах амебоцитов помимо полимеризующегося белка и фермента полимеризации имеются еще фенолы и фенолоксидаза. Благодаря им при активации системы образуются склеротизованные защитные белковые пленки. У ракообразных компоненты этих систем (белки с ферментами полимеризации и фенольный субстрат с фенолоксидазой) сосредоточены в гранулах разных клеток—мелко- и крупногранулярных амебоцитов.

Помимо пищеварительной и защитной функции лизосомы, осуществляющие гетерофагию в клетках многоклеточных животных, могут выполнять и некоторые другие функции. Так, например, клетки эпителия почечных канальцев обладают большим количеством лизосом и проявляют ярко выраженную фагоцитарную активность. При нарушении деятельности фильтрационных аппаратов нефрона, когда в первичную мочу попадают крупные органические молекулы и их комплексы (рис. 57, А), лизосомный аппарат обеспечивает расщепление этого материала.

При достаточно широком распространении гетерофагии у эукариотных клеток участием лизосом в этих процессах нельзя, однако, объяснить универсальности этого органоида—наличия его у подавляющего большинства эукариот независимо от уровня организации (будь то одноклеточные организмы или специализированные клетки Metazoa). Универсальность лизосом определяется их ролью в другом важном процессе—аутофагии—самопереваривании отдельных органоидов и участков цитоплазмы клеток, а также, по-видимому, молекул и надмолекулярных комплексов, поврежденных, необратимо изменившихся в результате старения или использующихся как материал для поддержания жизнедеятельности клетки в экстремальных условиях.

При типичной макроаутофагии подлежащий аутолизу участок цитоплазмы или органоид компартментализуется от окружающей цитоплазмы при помощи мембраны, образуя аутофагическую вакуоль (рис. 57, Б). Механизмы образования таких вакуолей различны, но материал для формирования их мем-



бран обычно поставляет либо ЭПС, либо аппарат Гольджи. Сформировавшаяся аутофагическая вакуоль приобретает способность «привлекать» к себе лизосомы, которые сливаются с ней, выделяя свои гидролазы в полость вакуоли, как при гетерофагии. В клетках растений, где гидролитические ферменты располагаются обычно в полости тонопласта — центральной вакуоли — аутофагия участков цитоплазмы и органоидов происходит несколько иначе: эти компоненты перемещаются в полость вакуоли, где и подвергаются ферментативной атаке.

Процессы аутофагии, по сути, представляют собой прежде всего аппарат физиологической регенерации отдельных клеточных структур — явление, свойственное всем клеткам без исключения, что и определяет наличие лизосом у всех эукариот. Однако, как и в случае гетерофагии с ее первичной трофической функцией, аутофагия в специализированных клетках может носить и иной характер, будучи направленной на реализацию каких-то специальных задач. Например, так называемая реконструктивная функция лизосом, широко распространенная и у животных, и у растений. Она связана со способностью многоклеточных организмов поддерживать в условиях голодания жизнедеятельность клеток благодаря эндогенному питанию, т. е. перевариванию при помощи лизосом части цитоплазматических структур и использованию образующихся низкомолекулярных соединений на нужды энергетического обмена.

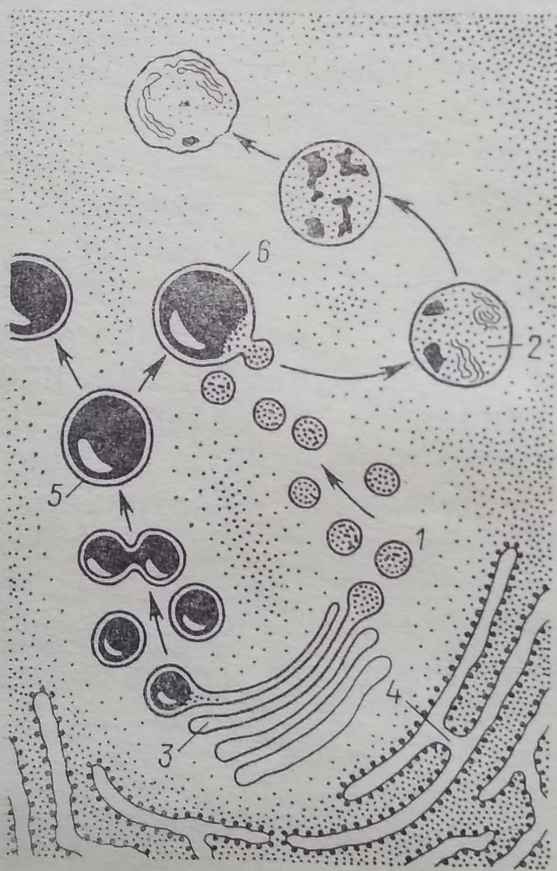


Рис. 58. Кринофагия (форма аутофагии) в секреторной клетке.

1 — первичная лизосома, 2 — вторичная лизосома, 3 — аппарат Гольджи, 4 — шероховатая ЭПС, 5 — секреторная гранула, 6 — слияние секреторной гранулы с лизосомой.

Более частным примером специфической аутофагии может служить деятельность лизосомного аппарата при гидролизе запасенных питательных веществ, что наблюдается в клетках жирового тела насекомых.

Более частным примером специфической аутофагии может служить деятельность лизосомного аппарата при гидролизе запасенных питательных веществ, что наблюдается в клетках жирового тела насекомых.

Еще одна разновидность аутофагии — утилизация избытков секрета — кринофагия (рис. 58), характерная для железистых клеток. Она может приобретать регуляторное значение, как, например, в клетках щитовидной железы и передней доли гипо-



физа. В этих случаях деятельность лизосом регулирует количество гормона, поступающего в кровь позвоночных животных.

Большое значение имеют процессы специфической аутофагии и, следовательно, регулируемая деятельность лизосом в эмбриогенезе, в морфогенетических процессах и при дифференцировке клеток некоторых тканей, как, например, при кератинизации в многослойном плоском ороговевающем эпителии.

Приведенный, далеко не полный, перечень примеров специфической аутофагии показывает, насколько широко используется этот древний механизм внутриклеточного обновления в эволюции у многоклеточных животных, в частности, при органной дифференцировке и гистогенезе.

Роль лизосомного аппарата в обеспечении процессов внутриклеточного катаболизма в эволюции позвоночных весьма ярко проявляется в обнаруженных у человека генетически обусловленных заболеваниях — так называемых болезнях накопления — тяжелых наследственных недугах, нередко приводящих к смертельному исходу. Суть их заключается в том, что у больных людей в результате генных мутаций появляются дефекты в системе лизосомальных ферментов, связанные с нарушением либо первичной структуры белковой молекулы, приводящим к резкому снижению активности фермента, либо транспорта ферментов в лизосомы (подробнее см. ниже), следствием чего является полное отсутствие одной из гидролаз в наборе гидролитических ферментов лизосом. Такие изменения в лизосомном аппарате приводят к тяжелым последствиям. Основная причина болезней накопления — перегрузка лизосом неперевааренными остатками различных соединений, для гидролиза которых необходим данный фермент.

Серьезные успехи достигнуты в изучении генеза лизосом в эукариотных клетках. Рассматривая организацию аппарата Гольджи, мы уже касались этого вопроса. Напомним основные этапы образования лизосомальных гидролитических ферментов. Эти ферменты синтезируются на рибосомах шероховатой сети. В полости цистерн ЭПС к ним присоединяется олигосахаридная цепь, несущая девять маннозных остатков. В процессе посттрансляционной модификации в аппарате Гольджи происходит фосфорилирование маннозы, что и служит надежной «визитной» карточкой этого белка как лизосомального фермента (рис. 53). При последующем прохождении через аппарат Гольджи такие белки не претерпевают существенных изменений и при помощи специальных транспортных пузырьков доставляются в первичные лизосомы (см. ниже).

Все сказанное выше свидетельствует о том, что лизосомы — это не просто пузырьки с ферментами, используемые от случая к случаю при гетеро- и аутофагии. Лизосомы — это морфологически сформированная древняя и интенсивно эволюционировавшая катаболическая система клетки. Эта система может



оказывать влияние даже на процессы клеточной дифференцировки, изменяя ее направление, что наблюдается, например, при воздействии избытка витамина А на зачатки многослойного ороговевающего эпителия. Витамин А избирательно действует на мембраны лизосом, обуславливая выход ферментов в гиалоплазму. Последние воздействуют на генетический аппарат клетки, либо непосредственно проникая в ядро, либо через цитоплазматические белки, в результате чего в эпителии происходит изменение направления дифференцировки клеток: вместо роговых чешуек образуются бокаловидные и ресничные клетки.

Место лизосом в общей вакуолярной системе клеток особенно ярко выявляется при анализе недавно открытого явления — опосредованного рецепторами эндоцитоза, при котором лизосомы вместе с другими органоидами (см. ниже) обеспечивают реализацию весьма тонкой сортировочной и распределительной функции в эукариотных клетках (см. рис. 64).

Внутриклеточная катаболическая система обладает большой функциональной и филогенетической пластичностью, хотя в основе ее деятельности лежат общие, универсальные для всех клеток элементарные механизмы. Естественно поэтому, что одной из самых актуальных задач исследования лизосом является выяснение структурно-биохимической организации этих общих элементарных механизмов. Решению такой задачи препятствуют и методические трудности выделения «чистых» фракций лизосом на разных этапах ауто- и гетерофагического циклов, и то, что лизосомы представляют собой более сложные образования, чем предполагалось на первых этапах их биохимического анализа.

В клетках существует еще одна система протеолитического расщепления белков, не связанная с деятельностью лизосом. Специальные протеазы — некомпартментализованные гидролитические ферменты гиалоплазмы — осуществляют постоянный контроль над белковым составом клетки, уничтожая короткоживущие белки цитозоля и белки с нарушением структуры, вызванным любыми факторами. В этих процессах принимает участие полипептид убиквитин (протеазы расщепляют только те белки, к которым присоединяется убиквитин, служащий как бы маркером для расщепления). Это небольшой белок, состоящий всего из 76 аминокислотных остатков и отличающийся эволюционной консервативностью — у дрожжей и в клетках млекопитающих имеются различия лишь по трем аминокислотам.

Каким образом убиквитин узнает белки, подлежащие расщеплению, выяснено не до конца; в этом направлении продолжаются интенсивные исследования. Определенную роль в процессе узнавания играют так называемые «дестабилизирующие» аминокислоты (12 из 20), расположенные на N-конце белковой молекулы.

Активация убиквитина происходит в результате его соедине-



ния со специальным активирующим ферментом; эта реакция требует энергии АТФ. Активированный убиквитин передается конъюгирующему ферменту, а с него переходит на субстрат — белок, подлежащий гидролизу. К первой молекуле убиквитина присоединяются другие так, что образуется разветвленная цепь убиквитиновых остатков, которая и служит маркером для ферментативной атаки. Комплекс убиквитин—субстрат подвергается гидролизу специальными протеазами, при этом происходит расщепление субстрата на короткие фрагменты и высвобождение убиквитина.

### 3.4.4. ПЕРОКСИСОМЫ И ДРУГИЕ МЕМБРАННЫЕ ОРГАНОИДЫ

Своеобразной функциональной разновидностью или скорее аналогом лизосом являются так называемые пероксисомы и микропероксисомы, называемые еще микротельцами. Эти органоиды, окруженные одной мембраной, имеются у простейших, грибов, высших растений и животных. У млекопитающих пероксисомы представлены двумя формами — универсальными мелкими (0,15—0,25 мкм) пузырьками, иногда связанными с гладкой ЭПС, и более крупными, характерными в основном для клеток печени и почек, пузырьками (0,5 мкм), часто с кристаллической упаковкой ферментов. Общим для всех разновидностей пероксисом являются маркерные ферменты — каталазы (40%), оксидазы D аминокислот и уратоксидазы. Мембрана пероксисом характеризуется большой проницаемостью для неорганических ионов и низкомолекулярных веществ.

Относительно природы пероксисом существуют два мнения — это либо особая модификация лизосомного аппарата, либо редуцированная форма органоида, который в домитохондрияльную эру развития эукариотных клеток осуществлял окислительные реакции, предохраняющие клетки от повреждений, вызванных избытком кислорода.

В пользу последнего предположения, вероятно, могут свидетельствовать пути развития пероксисом. По мнению одних исследователей, мембрана пероксисом образуется из гладкой сетки (а не из промежуточной ЭПС и транс-части аппарата Гольджи, которые являются источником мембран лизосом). По мнению других, пероксисомы образуются только в результате роста и деления предсуществующих пероксисом.

Ферменты пероксисом синтезируются на свободных рибосомах цитозоля и транслируются через мембрану уже после синтеза (ферменты пероксисом в отличие от лизосомальных ферментов не подвергаются существенным посттрансляционным изменениям). Сигналом, направляющим белки в пероксисому, по-видимому, служит определенная последовательность



аминокислот на С-конце молекулы, которую узнает специфический рецептор, расположенный в мембране пероксисомы.

По ряду данных компоненты мембраны пероксисом, в том числе и липиды, также поступают в эти органоиды из цитозоля.

Одна из основных функций пероксисом — окисление субстратов с образованием перекиси водорода, которая тут же утилизируется для окисления с помощью каталазы других разнообразных субстратов, в том числе фенолов, спиртов, формальдегида и т. д., что имеет существенное значение для обеззараживания вредных веществ. Это особенно важно для клеток печени и почек, обеспечивающих детоксикацию попадающих в кровь токсичных компонентов. Избыток перекиси водорода также с помощью каталазы может разрушаться с образованием воды.

Важную роль играют пероксисомы и в метаболизме липидов. Они катализируют распад жирных кислот до ацетилкоэнзима А. Последний транспортируется либо в матрикс митохондрий, либо в другие участки цитоплазмы, где принимает участие в цикле лимонной кислоты (митохондрии) или в биосинтетических реакциях.

Состав ферментов в пероксисомах может широко варьировать как в разных клетках одного организма, так и в одних и тех же клетках в зависимости от внешних условий. Пероксисомы легко приспосабливаются к изменениям условий среды. Так, клетки дрожжей, растущих на среде, содержащей сахар, имеют очень мало пероксисом. Если эти же клетки культивировать в присутствии метанола, то в них образуется большое количество пероксисом, окисляющих метанол. В клетках дрожжей, помещенных в среду, богатую жирными кислотами, появляются пероксисомы, которые расщепляют эти кислоты с образованием ацетилкоэнзима А.

Особые пероксисомы имеются у высших растений. В клетках листьев они катализируют окисление одного из побочных продуктов реакции фотосинтеза, в которой  $\text{CO}_2$  восстанавливается в углевод. Этот процесс получил название фотодыхания, в ходе его поглощается  $\text{O}_2$  и выделяется  $\text{CO}_2$ .

В богатых жиром прорастающих семенах растений имеются пероксисомы другого типа, необходимые для преобразования жиров в углеводы. Эта разновидность пероксисом получила название глиоксисом, так как они обеспечивают превращение жирных кислот запасенных липидов в сахара с помощью реакций глиоксалатного цикла. При этом молекулы ацетилкоэнзима А, образующегося в процессе окисления жирных кислот, используются для синтеза янтарной кислоты, которая покидает пероксисому и уже за ее пределами превращается в глюкозу.

Таким образом, пероксисомы — органоид, свойственный всем эукариотным клеткам в большей или меньшей степени и выполняющий весьма разнообразные функции. Общим для всех раз-



новидностей пероксисом является их участие в метаболизме липидов и перекиси водорода. Весьма возможно, что какие-то функции этих органоидов ускользнули от внимания исследователей; на принципиальную важность пероксисом для организма указывает, например, такой факт: генетические нарушения у человека, проявляющиеся в отсутствии пероксисом, приводят к гибели новорожденных через несколько месяцев.

Гликосомы — еще одна весьма своеобразная разновидность органоидов, ограниченных одной мембраной и содержащих компартментализованные ферменты. Они обнаружены у трипаносом (паразитических простейших) и обеспечивают процессы углеводного обмена. Эти органоиды представляют собой круглые или эллипсоидные пузырьки диаметром около 0,3 мкм с электронно-плотным матриксом, иногда содержащие кристаллическое «ядро» (как и пероксисомы). Количество гликосом в клетке может быть достаточно велико (200—300), что составляет около 4% объема клетки.

Ферменты гликосом синтезируются в цитозоле и затем транспортируются в гликосому; концевые сигнальные последовательности у них отсутствуют. В гликосомах содержатся девять ферментов гликолитического цикла, осуществляющих превращение глюкозы и глицерина в фосфоглицеридную кислоту.

У других эукариотных клеток эти процессы не компартментализованы и происходят в примембранном цитозоле. Компартментализация гликолитических процессов у трипаносом обеспечивает значительно более тонкую регуляцию и большую интенсивность углеводного обмена — гликолиз в гликосомах трипаносом идет со значительно большей скоростью, чем у любых других эукариот.

Интересно отметить, что гликосомы характерны только для трипомастиготной формы трипаносом, которая находится в крови хозяина и извлекает растворенную глюкозу непосредственно из плазмы крови; на критидиальной стадии развития трипаносом, протекающей в кишечнике мухи цеце, гликосомы не обнаруживаются.

Существует еще одна разновидность мембранных органоидов — гидрогеносомы — округлые или овальные тельца диаметром 300—500 нм, окруженные очень тонким слоем электронно-плотного матрикса. Они обнаружены у ряда паразитических простейших: жгутиконосцев (трихомонад), инфузорий и нескольких свободноживущих форм, обитающих в условиях дефицита кислорода.

Эти органоиды содержат системы ферментов, окисляющих пировиноградную кислоту с образованием АТФ. Конечным акцептором электронов служат протоны; в результате этого процесса образуется молекулярный водород (отсюда название — гидрогеносомы). У трихомонад в гидрогеносомах имеются так-



же ферменты, позволяющие им переживать в аэробных условиях, используя кислород.

Сведения о некоторых других мембранных органоидах (кальцийсомы, транспортные пузырьки и т. д.) приведены в соответствующих разделах.

### 3.5. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ВЗАИМОСВЯЗЬ ОСНОВНЫХ МЕМБРАННЫХ ОРГАНОИДОВ АНАБОЛИЧЕСКОЙ И КАТАБОЛИЧЕСКОЙ СИСТЕМ ЦИТОПЛАЗМЫ

Первое обобщение данных о мембранных органоидах цитоплазмы было сделано еще в период доминирования «бутербродной» модели организации биологических мембран. В начале 60-х годов наибольшее признание получила гипотеза унитарной мембраны. Она базировалась на многочисленных данных электронно-микроскопических исследований различных клеток и их мембранных структур. Обнаруживаемое на электронных фотографиях при обычных методах обработки материала трехслойное строение мембран, а также единичные наблюдения взаимных переходов плазматической мембраны, мембран ЭПС, аппарата Гольджи и ядерной оболочки привели исследователей к выводам, которые составили главные положения гипотезы унитарной мембраны.

Один из них постулирует единый принцип организации всех биологических мембран, а именно наличие внутреннего билипидного слоя и сплошных поверхностных белковых слоев. Различия в толщине мембран определялись, по этим представлениям, именно белковыми слоями. Другое положение унитарной гипотезы заключалось в констатации существования в цитоплазме непрерывной сети цистерн и каналов (рис. 59, А). По этой гипотезе дифференцировка мембран разных органоидов определяется лишь различиями в их функциональной специализации и не препятствует установлению между ними структурных контактов и многочисленных взаимных переходов.

Несмотря на положительные моменты унитарной гипотезы как первой попытки обобщения фактического материала об ультраструктурной организации метаболического аппарата цитоплазмы, в настоящее время она представляет лишь исторический интерес.

Упрощенное понимание истинных отношений между мембранными органоидами клетки привело создателей унитарной гипотезы к представлению о непосредственном сообщении с внешней средой всей разветвленной системы каналов и цистерн ЭПС, аппарата Гольджи и даже ядерной оболочки (рис. 59, А), получившему широкое распространение в учебной литературе.



ре 60-х годов. Эти взгляды игнорировали идею компартиментализации биохимических процессов, трехфазную организацию цитоплазмы и сильно умаляли значение поверхностного аппарата во взаимодействии клетки с внешней средой. Поскольку последнее положение по мере развития биологии клетки получали все большее подтверждение, то уже к концу 60-х годов несостоятельность унитарной теории стала очевидной многим исследователям.

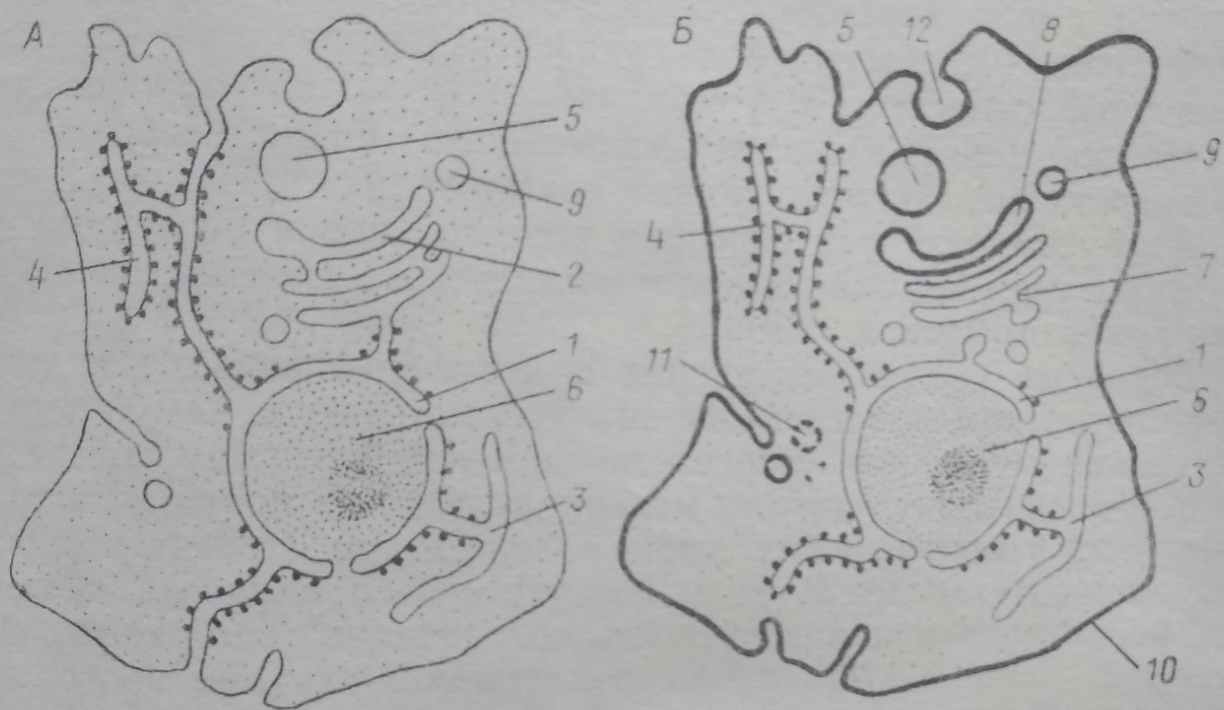


Рис. 59. Взаимодействие мембранных структур эукариотических клеток по представлениям Дж. Робертсона и К. де Дюва.

А — унитарная мембрана Робертсона, Б — эндо-(тонкие линии) и экзоплазматические (жирные линии) мембраны де Дюва. 1 — цистерны ядерной оболочки; 2 — цистерны аппарата Гольджи; 3 — гладкая ЭПС; 4 — шероховатая ЭПС; 5 — секреторные гранулы; 6 — ядро с ядрышком; 7 — регенераторный и 8 — функциональный полюса аппарата Гольджи; 9 — лизосомы; 10 — плазматическая мембрана; 11 — разборка мембран экзоплазматического типа; 12 — экзоцитозный пузырь.

Лучше соответствовало разностороннему фактическому материалу и значительно более биологичным было представление о внутриклеточном вакууме и экзоплазматическом пространстве, предложенное в 1966 г. бельгийским биохимиком К. де Дюве, которому также принадлежит честь открытия лизосом (рис. 59, Б). Де Дюв разделил все клеточные мембранные структуры на два типа: эндоплазматические и экзоплазматические. К первому типу были отнесены мембраны ЭПС, ядерной оболочки и наружная мембрана митохондрий. Во втором типе де Дюв объединил плазматическую мембрану и мембраны непосредственно связанных с поверхностным аппаратом внутриклеточных образований — секреторных гранул, фаго- и пиносом и лизосом. Помимо различий в толщине и в химическом составе мембраны эндоплазматического и экзоплазматического типов отличаются способностью к объединению и формированию не-



прерывных переходов только в пределах структур, построенных из мембран данного типа. Прямое объединение мембран эндо- и эктоплазматического типов обычно невозможно, что и обуславливает отчетливое разделение внутримембранной фазы на две части: эндо- и эктоплазматическую.

В клетке, по мнению де Дюва, наблюдается закономерный, но односторонний переход мембран эндоплазматического типа в мембраны эктоплазматического типа. Этот переход осуществляется в аппарате Гольджи, часть мембранных образований которого имеет характеристики мембран эндоплазматического типа, а часть (обычно более дифференцированные «зрелые» структуры) относятся к мембранам эктоплазматического типа.

Переход мембран эктоплазматического типа в мембраны эндоплазматического типа может осуществляться, по де Дюву, только путем разборки мембран первого типа и последующего формирования мембран эндоплазматического типа из возникающих при этом блоков.

Основные положения учения о клеточном вакууме и эктоплазматическом пространстве значительно лучше, чем гипотеза унитарной мембраны, соответствовали накопленному к середине 60-х годов фактическому материалу. Они не вступали в противоречия с отмеченными выше положениями (трехфазная организация цитоплазмы, роль поверхностного аппарата клеток, дифференцировка и пластичность организации мембранных систем). В связи с этим учение о клеточном вакууме не только обобщило фактические данные, но и стимулировало целенаправленные общецитологические исследования взаимоотношений мембранных клеточных систем на широком круге объектов.

В частности, с помощью межклеточных маркеров (гидроокси-лантана, пероксидазы хрена) удалось показать наличие в некоторых клетках своеобразного процесса — компенсаторного эндоцитоза. Так, в секреторных клетках экзокриновой части поджелудочной железы на боковых и базальных поверхностях идет постоянное образование эндоцитозных пузырьков (рис. 60, А), благодаря чему поверхность мембраны клетки при экзоцитозе секреторных гранул не увеличивается.

Интересный вариант этого же процесса был обнаружен в пресинаптической области нервно-мышечного синапса при длительном раздражении нерва электрическим током (рис. 60, Б). В данных условиях стимулировался выход синаптических пузырьков на поверхность пресинапса, где и осуществлялось их встраивание в пресинаптическую мембрану, поверхность которой при этом не увеличивалась, так как в боковых частях пресинапса стимулировался эндоцитоз. Новообразованные эндоцитозные пузырьки сливались с расположенной в пресинапсе цистерной, ограниченной мембраной. Из этой цистерны и формировались новые синаптические пузырьки, отличающиеся от эндоцитозных пузырьков тонким строением стенки.



Таким образом, в этом случае происходит морфологически выраженная перестройка мембранных и примембранных структур. Такого рода явление характерно и для апикальной части

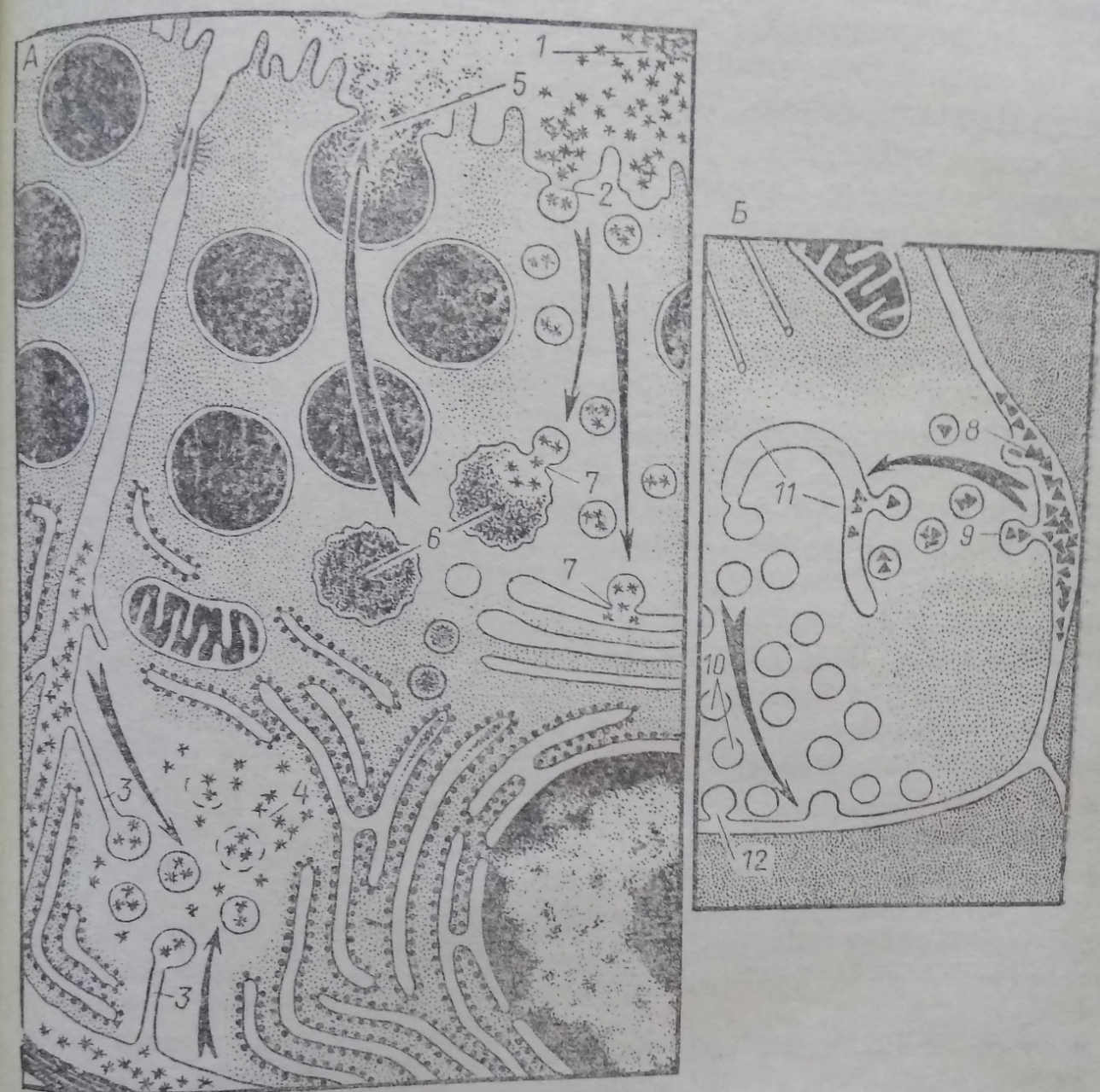


Рис. 60. Компенсаторный эндоцитоз в секреторных клетках поджелудочной железы (А) и в пресинапсе (Б).

1 — частицы маркера (гидроокиси лантана); 2, 3 — компенсаторный эндоцитоз на апикальной (2) и базолатеральной (3) поверхностях клетки; 4 — разборка пиноцитозных пузырьков и попадание маркера в цитоплазму; 5 — экзоцитоз секреторной гранулы; 6 — конденсационная вакуоль; 7 — слияние компенсаторного пузырька с конденсационной вакуолью и цистерной аппарата Гольджи; 8 — частицы маркера (пероксидазы хрена); 9 — компенсаторный эндоцитоз на латеральной поверхности пресинапса; 10 — синаптический пузырек; 11 — трансформация мембранного материала; 12 — экзоцитоз синаптического пузырька.

секреторных клеток поджелудочной железы. С помощью межклеточных маркеров обнаружили, что образующиеся в этой области эндоцитозные пузырьки взаимодействуют с конденсационными вакуолями и транс-цистернами аппарата Гольджи.

Подобные перестройки мембран и примембранных слоев обычно связаны с внутриклеточным транспортом секретируемых



продуктов белкового синтеза. Изучение транспортных процессов непосредственно связано с изучением взаимодействия мембранных структур метаболического аппарата цитоплазмы. Такие исследования удобнее всего проводить на модельных объектах — экзокриновых клетках поджелудочной железы или других белоксинтезирующих клетках, в которых синтезируемые продукты претерпевают те или иные превращения.

В серии работ Дж. Паладе с сотрудниками были выяснены точные временные параметры секреторного цикла в экзокриновых клетках поджелудочной железы морской свинки. Это было сделано с помощью сочетания биохимических и морфологических методов — дифференциального центрифугирования и электронной автордиографии. Используя меченые предшественники белкового синтеза, удалось показать, что в цистернах ЭПС меченый белок появляется уже через 3 мин после импульсного мечения. Через 17 мин почти весь меченый белок сосредоточивается в транспортных пузырьках, а еще через 20 мин — в конденсационных вакуолях аппарата Гольджи. Экзоцитоз секреторных гранул с меченым белком наступает через 1—1,5 ч с момента синтеза секрета в шероховатой ЭПС. Подобные данные были позднее получены на аналогичных клетках других видов млекопитающих и амфибий, а также на других белковых железистых клетках позвоночных и беспозвоночных животных. При этом оказалось, что пути транспорта секретируемых соединений в области аппарата Гольджи могут варьировать у разных видов млекопитающих даже в аналогичных клетках. Широко варьирует и длительность отдельных этапов внутриклеточного транспорта, и характер преобразования мембранных структур. Однако общие закономерности этих процессов сходны в клетках, секретирующих самые разнообразные белки у разных животных.

Возможность выяснения временных параметров отдельных этапов внутриклеточного транспорта секрета в нормальных условиях создает предпосылки для экспериментального анализа этого процесса путем воздействия на конкретные звенья внутриклеточного метаболизма и на различные структуры гиалоплазмы (например, блокирование синтеза белка, АТФ, жирных кислот, разрушение микротрубочек и микрофиламентов). Такой анализ, проведенный на экзокриновых клетках поджелудочной железы, позволил выявить несколько этапов внутриклеточного транспорта, каждый из которых блокируется воздействием специфических агентов. К данным этапам относятся: синтез белка на рибосомах и транспорт его через мембрану ЭПС, перемещение секрета по каналам ЭПС, образование транспортных пузырьков и их перемещение к конденсационным вакуолям, превращение вакуолей в секреторные гранулы и экзоцитоз секреторных гранул. При этом оказалось, что, несмотря на строгую последовательность всех этих процессов в условиях нормальной



секреторной деятельности, блокирование одного этапа не тормозит дальнейшие звенья процесса и никак не сказывается на предыдущих. Иными словами, сложный процесс внутриклеточных превращений и транспорта секрета состоит из отдельных этапов, не связанных между собой жесткой причинно-следственной зависимостью. Строгая координация их во времени в нормальных условиях обуславливается действием интегративных внутриклеточных механизмов.

Такой принцип организации внутриклеточного транспорта секрета является частным проявлением организации процессов метаболизма, репродукции клеток и других важных сторон их жизнедеятельности. Он обеспечивает высокую пластичность клеточной организации и возможность возникновения в процессе эволюции на основе относительно небольшого количества общих для всех клеток элементарных механизмов значительного разнообразия их комбинаций.

Одним из проявлений такого рода пластичности мембранных структур служит различие в характере транспорта секрета в области аппарата Гольджи в клетках экзокриновой части поджелудочной железы у близких видов млекопитающих. У морской свинки транспортные пузырьки с белком объединяются непосредственно с конденсационными вакуолями; у мышевидных грызунов они поступают к цистернам аппарата Гольджи. Интересно отметить, что если воздействовать на поджелудочную железу морской свинки агентами, стимулирующими секрецию, то путь внутриклеточного транспорта секретиремых продуктов изменяется и транспортные пузырьки с белком сливаются не с конденсационными вакуолями, а с цистернами аппарата Гольджи.

Как видно из всего вышесказанного, взаимоотношения мембранных структур в анаболических процессах (например, при синтезе и формировании сложных соединений и их внутриклеточном транспорте) достаточно многообразны (рис. 61). Не менее разнообразны и пути взаимодействия мембранных органоидов в катаболических процессах (рис. 61); в качестве примера достаточно напомнить варианты образования мембран аутофагической вакуоли (наиболее распространенный способ формирования ее из цистерн эндоплазматической сети путем сложной перестройки двух мембран ЭПС, из пузырьков, образуемых аппаратом Гольджи в клетках жирового тела насекомых и, наконец, путем слияния самих лизосом — как в клетках желтого тела млекопитающих).

Единство мембранных органоидов цитоплазмы проявляется также в возможности изменения локализации белков, обеспечивающих различные метаболические процессы — транспорт ионов кальция (ЭПС, митохондрии), синтез полисахаридов (ЭПС, АГ) и многие другие.

Заключение о единстве мембранных органоидов цитоплазмы



и большой эволюционной пластичности рассматриваемой метаболической системы было сделано на основании всех этих данных достаточно давно.



Рис. 61. Схема взаимоотношений мембранных структур в клетке.

1 — ядерная оболочка; 2 — гладкая и 3 — шероховатая эндоплазматическая сеть; 4 — транспортные пузырьки; 5 — аппарат Гольджи; 6—8 — формирование секреторных гранул через конденсационные вакуоли (6), пузырьки (7) или цистерны (8) транс-части аппарата Гольджи; 9 — секреторные гранулы; 10 — первичные лизосомы; 11—14 — участие первичных лизосом в процессах кринофагии (11), гетерофагии (12), аутофагии (13), опосредованного рецепторами эндоцитоза (14); 15 — цикл вторичных лизосом; 16 — образование из осмиофильных пузырьков аппарата Гольджи (17), ЭПС (18) и мембран лизосом (19); 20 — экзоцитоз; 21 — пиноцитоз; 22 — фагоцитоз; 23 — трансцитоз; 24 — опосредованный рецепторами эндоцитоз; 25 — сортировка в эндосоме; 26 — рециклирование рецепторов; 27 — компенсаторный эндоцитоз; 28 — плазматическая мембрана.

Однако большинство фактов о взаимодействии мембранных структур носили косвенный, описательный характер, а приведенные выше заключения и выводы базировались в основном



на результатах морфологических и автордиографических исследований. Основным недостатком этих методов было отсутствие возможности качественного разделения секреторных, лизосомальных и мембранных белков. Без такого разделения трех основных белковых компонентов невозможно составить достаточно точного представления о функциональном значении и особенностях взаимосвязи основных компартментов клетки. Кроме того, необходимо было также знать и маркерные белки мембран этих компартментов, а также динамику их обновления.

Некоторое углубление представлений о конкретном составе, функции и обновлении мембран отдельных компартментов клетки привело к формулировке новой концепции, детализирующей и конкретизирующей учение де Дюва об эндо- и экзоплазматических мембранах. Эта концепция получила название потока дифференцирующихся мембран (membrane flow differentiation). Суть ее заключалась в следующих положениях: 1) в современных эукариотных клетках нет новообразования мембран, они возникают из предсуществующих мембран; 2) местом синтеза основных мембранных белков является шероховатая ЭПС и наружная мембрана ядерной оболочки; 3) разнообразие белкового состава мембран достигается в основном за счет неравномерного их распределения в процессе перемещения от шероховатой ЭПС в плазматическую мембрану.

Эта концепция получила большое распространение к середине 70-х годов, несмотря на отсутствие строгих доказательств вышеуказанных положений. Больше того, уже в момент формулировки теории было известно, что основные маркерные ферменты цистерн аппарата Гольджи синтезируются не на шероховатой сети, а на специальных свободных рибосомах в гиалоплазме и уже после синтеза встраиваются в мембрану. В дальнейшем факты синтеза мембранных белков на свободных рибосомах были получены и в отношении других мембран и содержимого вакуолярных клеточных структур (гладкая ЭПС, плазматическая мембрана, пероксисомы).

Таким образом, становилось ясным, что различия в белковом составе мембран могут определяться не только дифференцированным их перемещением из эндо- в экзомембранные системы, а непосредственным встраиванием специфических белков в мембраны соответствующих органоидов.

Данные, противоречащие теории потока дифференцирующихся мембран, стали накапливаться в конце 70-х и в 80-е годы, когда у исследователей появились возможности детального качественного и количественного анализа клеточных структур по мере совершенствования методов дифференциального центрифугирования, особенно в отношении модельных объектов, и в том числе излюбленного тест-объекта «структурных» биохимиков — клеток печени млекопитающих. Существенную роль в углубле-



нии наших представлений сыграло также широкое использование в качестве объекта исследования клеток, зараженных вирусом, в которых вирусные белки подвергались тем же изменениям, что и клеточные (см. ниже). Но особенно чувствительный удар по теории потока дифференцирующихся мембран и идее непосредственного одностороннего перехода эндо- и экзо-

мембраны нанесли новые данные об организации и функции аппарата Гольджи. Напомним, что раньше аппарат Гольджи считали динамичной структурой, полагая, что в его цис-части происходит непрерывное новообразование цистерн (из ЭПС), которые быстро превращаются в секреторные гранулы, перемещаясь от цис- к транс-части и далее (в виде секреторных гранул) к апикальной поверхности клеток.

В настоящее время убедительно доказано, что аппарат Гольджи представляет собой структуру, состоящую из трех стабильных и биохимически дифференцированных компартментов, в каждом из которых происходят определенные этапы метаболических процессов, осуществляемых с помощью особого набора ферментов (рис. 62).

С этой точки зрения принципиальное значение приобретает вопрос о механизмах связи между компартментами аппарата Гольджи, а также цис-цистерн с ЭПС и транс-части с лизосомами и поверхностным аппаратом клетки — вопрос о механизмах внутриклеточного транспорта секретирова-

емых соединений. Очевидно, что в клетке должны быть специальные транспортные системы, обеспечивающие перемещение веществ из одного постоянного компартмента в другой.

Наличие такой транспортной системы между средними и транс-цистернами аппарата Гольджи продемонстрировано в опытах Дж. Ротмана (рис. 63), проведенных на культивируе-

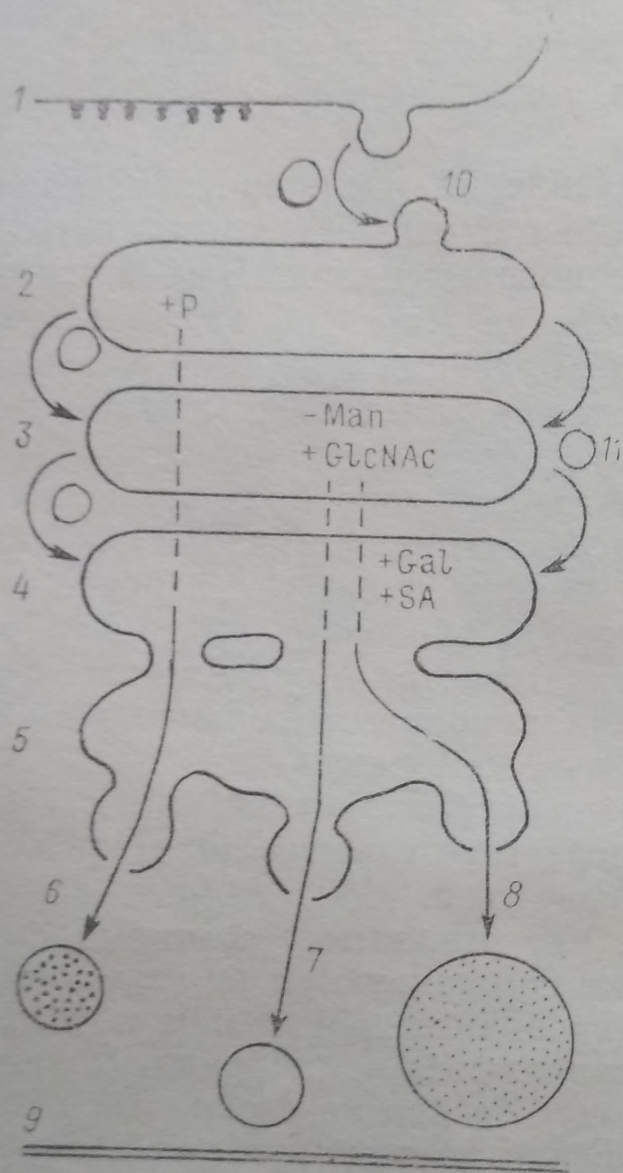


Рис. 62. Участие аппарата Гольджи в посттрансляционной обработке синтезированных белков.

1 — ЭПС с рибосомами; 2 — цис-, 3 — средний, 4 — транс- и 5 — транс-распределительный отделы аппарата Гольджи; 6 — лизосомный вакуоль; 7 — путь конститутивной секреции; 8 — путь стимулированной секреции; 9 — плазматическая мембрана.



рых *in vitro* клетках линии СНО. Мутантные клетки этой линии, лишенные фермента галактозилтрансферазы, в норме локализуемой в транс-цистернах аппарата Гольджи, были заражены вирусом везикулярного стоматита (VSV); зараженные

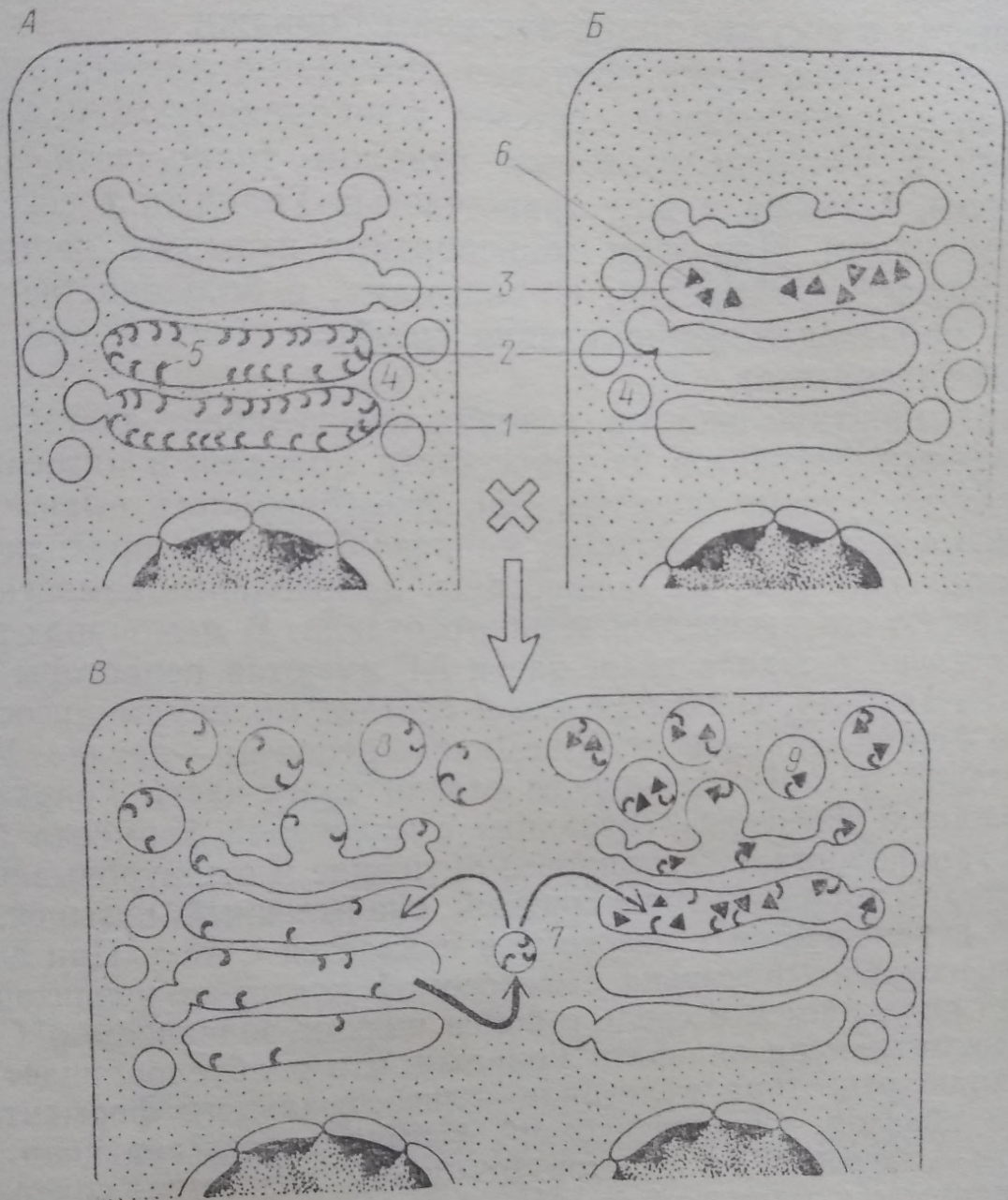


Рис. 63. Упрощенная схема опыта Дж. Ротмана.

А — зараженная вирусом мутантная клетка без галактозилтрансферазы, Б — нормальная незараженная клетка, В — гибридная клетка. 1 — цис-, 2 — средние, 3 — транс-цистерны и 4 — пузырьки аппарата Гольджи; 5 — белок вируса; 6 — галактозилтрансфераза и галактоза в нормальной клетке; 7 — транспортный пузырек мутантной клетки с негалактозилированным белком; 8, 9 — секреторные гранулы с негалактозилированным (8) и галактозилированным (9) белком.

клетки синтезировали G-белки вируса, но не могли присоединить к ним остаток галактозы из-за отсутствия галактозилтрансферазы. Затем зараженную клетку гибридизировали с нормальной клеткой, имеющей в аппарате Гольджи фермент галактозилтрансферазу, но не зараженной вирусом VSV, а следовательно, и не синтезирующей G-белки. Через некоторое время из гибридной клетки выделили G-белки, и оказалось, что



около 50% G-белков галактозилированы, а значит, прошли обработку в транс-части аппарата Гольджи нормальной клетки, содержащей галактозилтрансферазу. Очевидно, что эти белки могли попасть сюда только при помощи транспортных пузырьков зараженных клеток, которые транспортировали G-белки как в свои, так и в чужие транс-цистерны Гольджи.

В настоящее время получено множество данных о том, что подобные транспортные системы функционируют между лизосомами и распределительным отделом транс-части аппарата Гольджи, а также между транс-частью Гольджи и секреторными гранулами. При этом транспортные пузырьки часто имеют клатриновое окаймление; по-видимому, в большинстве случаев здесь происходит рециркуляция мембран (как и при клатриновом эндоцитозе).

Транспортная система, которая обеспечивает доставку лизосомальных ферментов из транс-части Гольджи в лизосомы, работает следующим образом. Как уже говорилось выше, лизосомальные ферменты, несущие маннозо-6-фосфат, проходят через аппарат Гольджи, не подвергаясь дальнейшим изменениям, и достигают его распределительного отдела. В мембранах распределительного отдела транс-части АГ имеются рецепторы к маннозо-6-фосфату, узнающие его в составе молекулы лизосомального фермента. Образуется комплекс рецептор—лиганд. Участок цистерны распределительного отдела транс-части Гольджи, содержащий рецепторы, связанные с молекулой фермента (лигандом), приобретает клатриновое опушение и отшнуровывается от цистерны, образуя транспортный окаймленный пузырек, который перемещается к лизосоме и сливается с нею. При слиянии транспортного пузырька с лизосомой комплекс рецептор—лиганд оказывается в среде с более низким значением рН, чем в полости цистерн аппарата Гольджи, что и обуславливает диссоциацию рецептора и лиганда—лизосомального фермента. Таким образом, гидролитический фермент достигает цели своего пути—лизосомы, а участок мембраны лизосомы, содержащий рецепторы к маннозо-6-фосфату (точнее, участок мембраны, принадлежавший ранее транспортному пузырьку) отшнуровывается от лизосомы и в составе окаймленного транспортного пузырька возвращается в АГ, сливаясь с мембраной распределительного отдела транс-части Гольджи (рис. 64).

Интересно отметить, что генетически обусловленные болезни накопления (рассмотренные в разделе, посвященном морфологической организации лизосом) в некоторых случаях вызываются не дефектом в системе синтеза лизосомальных ферментов, а отсутствием в мембранах аппарата Гольджи именно рецептора к маннозо-6-фосфату. При этом нарушается нормальный транспорт гидролитических ферментов, которые в таких случаях не доставляются в лизосому, а вместе с другими секреторными белками покидают клетку.



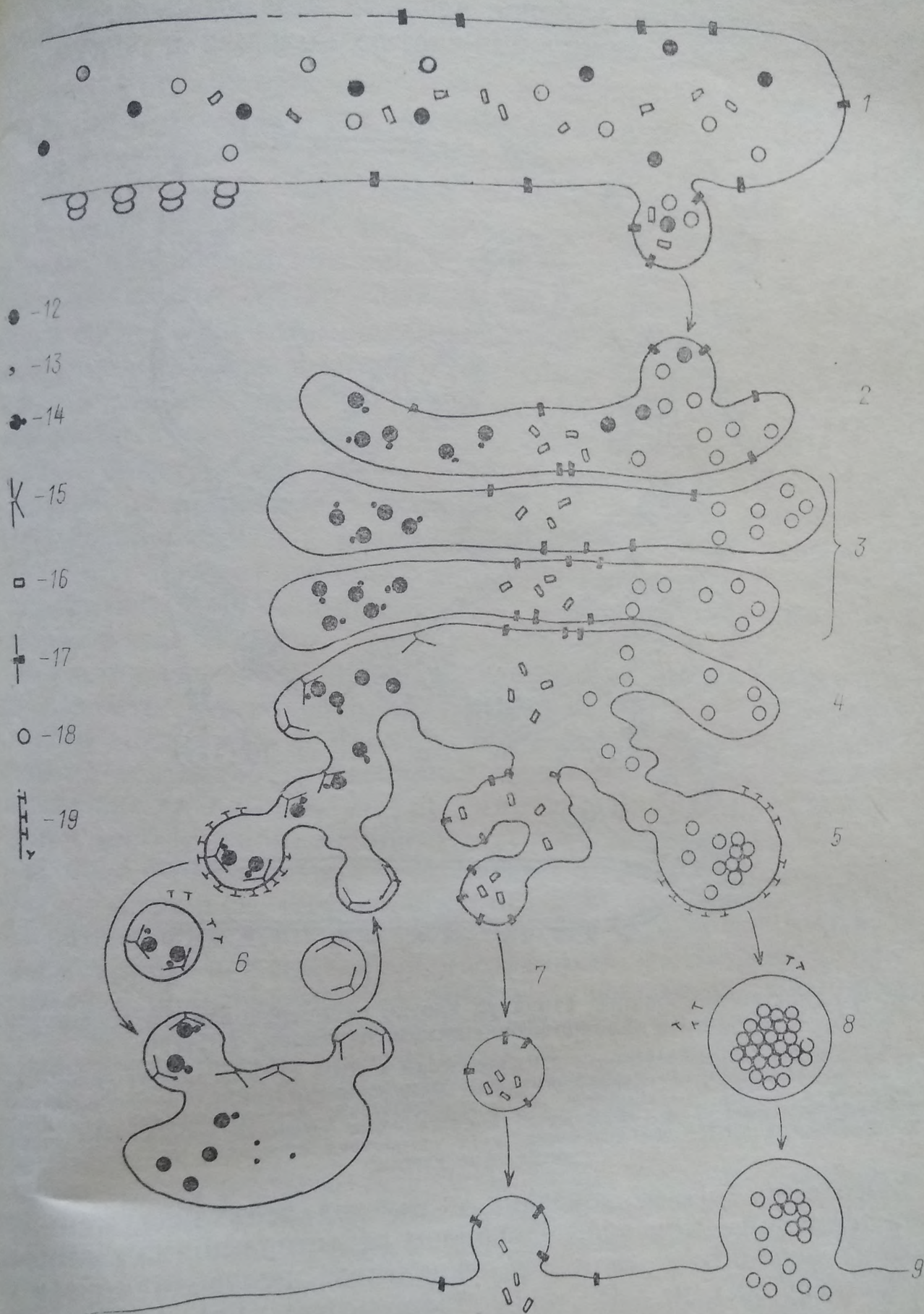


Рис. 64. Участие аппарата Гольджи в сортировке синтезированных белков. 1-9 — как на рис. 62; 10, 11 — транспортные пузырьки, циркулирующие между ЭПС и аппаратом Гольджи (10) и между цистернами аппарата Гольджи (11); 12 — ферменты; 13 — фосфатная группа; 14 — ферменты лизосом, несущие фосфатную группу; 15 — рецептор к маннозо-6-фосфату; 16 — белки конститутивной секреции; 17 — белки стимулируемой секреции; 18 — секреторные белки; 19 — клатриновое опушение.



Аналогичные рециклирующие транспортные системы обеспечивают, по-видимому, перенос веществ между компартментами аппарата Гольджи, между цис-частью Гольджи и ЭПС и т. д.

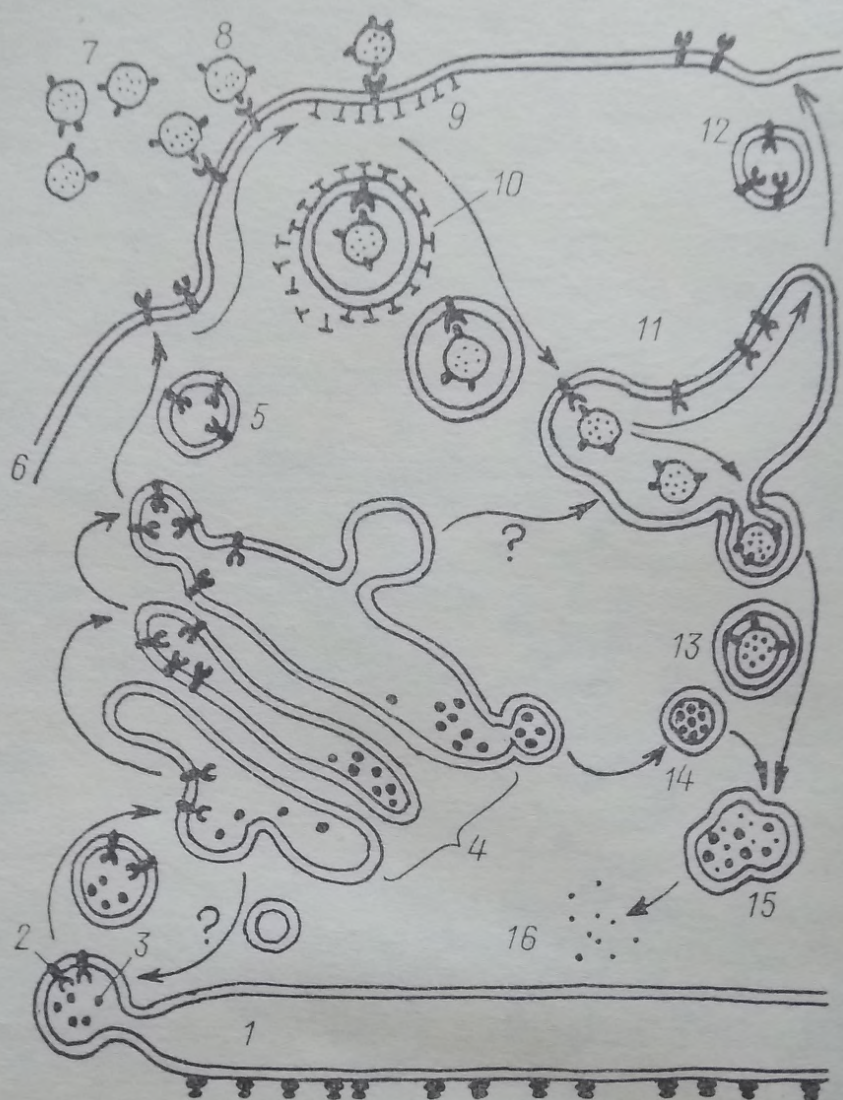


Рис. 65. Участие мембранных структур клетки в опосредованном рецепторами эндоцитозе липопротеинов низкой плотности (ЛНП).

1 — ЭПС; 2, 3 — синтезированные в ЭПС рецепторы к ЛНП (2) и ферменты лизосом (3); 4 — аппарат Гольджи; 5 — секреторные пузырьки с рецепторами; 6 — плазматическая мембрана; 7 — ЛНП; 8 — комплекс ЛНП с рецептором; 9 — окаймленная ямка; 10 — окаймленный пузырек; 11 — эндосома; 12 — пузырек с рециклирующими рецепторами; 13 — пузырьки в ЛНП; 14 — первичная и 15 — вторичная лизосомы; 16 — холестерол в цитоплазме клетки.

Особенно хорошо доказана и изучена рециклика мембран при так называемом опосредованном рецепторами (или клатриновом) эндоцитозе. Этот тип эндоцитоза подробно описан у культивируемых *in vitro* фибробластов (рис. 65). Они интенсивно поглощают из плазмы липопротеины низкой плотности (ЛНП) — вещества, синтезируемые в печени и служащие источником холестерина, необходимого для построения клеточных мембран (см. выше). ЛНП присоединяются к специальным рецепторам, расположенным в мембране фибробластов; задействованные ЛНП-рецепторы собираются в определенных участках мембран — так называемых окаймленных ямках, на цито-



плазматической стороне которых находится белок клатрин (см. выше). Из этих ямок путем инвагинации образуются окаймленные пузырьки, которые поступают в цитоплазму и там теряют клатриновую оболочку (см. ниже). Затем такие «раздетые» пузырьки сливаются между собой, формируя особую структуру, которую называют эндосомой, рецептосомой, или системой CURL (compartment for uncoupling receptor and ligand — компартмент для разделения рецептора и лиганда). Здесь лиганд — в данном случае ЛНП — отделяется от рецептора благодаря кислой среде, существующей в эндосоме и создающейся за счет работы встроенной в мембрану эндосомы (как и лизосомы)  $H^+$ -АТФазы. Затем от мембраны эндосомы отшнуровываются транспортные пузырьки двух видов: одни содержат ЛНП и сливаются с лизосомами, где из ЛНП и выплывается холестерин, а другие (содержащие свободные от лиганда рецепторы к ЛНП) возвращаются к поверхности клетки — либо непосредственно, либо через транс-часть аппарата Гольджи — и сливаются с плазматической мембраной. Так осуществляется рециклика мембран в этой системе.

В настоящее время в разных клетках млекопитающих удалось выявить ряд рецепторов, обеспечивающих процессы клатринового эндоцитоза и проследить некоторые механизмы регуляции их деятельности (асиалогликопротеиновые, инсулиновые, иммуноглобулиновые и др. рецепторы). При этом оказалось, что при клатриновом эндоцитозе судьба задействованного лиганда может быть разной — от полной деградации его в лизосомах до переноса через клетку без всяких изменений путем трансцитоза. Между этими крайними вариантами могут быть и промежуточные — с частичной деградацией поглощенных продуктов и использованием их либо в анаболических процессах (холестерол), либо в качестве регуляторных молекул. Возможно, что специфические регуляторные молекулы могут поступать в ядерный аппарат и непосредственно из системы CURL и лизосом; имеются косвенные данные в пользу такого предположения.

Несмотря на большое количество работ, посвященных этому виду эндоцитоза и вообще внутриклеточному транспорту, многие важные вопросы остаются все еще невыясненными. Например, о конкретной роли клатринового опущения. Предполагают, что клатрин способствует отшнуровыванию транспортного пузырька от донорного компартмента. Однако в последнее время появились данные о том, что транспорт может происходить и с помощью каких-то разновидностей гладких пузырьков; более того, в некоторых клетках обнаружены так называемые «поло-сатые» пузырьки, имеющие характерное окаймление, но определенно не клатриновой природы. Кроме того, детальные исследования взаимодействия транспортных пузырьков с донорными и акцепторными компартментами позволили выделить многие



белковые факторы, необходимые для осуществления внутриклеточного транспорта; предполагают, что окаймленные пузырьки могут участвовать как в процессах узнавания пузырьком своей мишени — соответствующего акцепторного компартмента, так и в обеспечении слияния мембран.

В метаболическом аппарате цитоплазмы практически на каждом этапе транспорта должны происходить те или иные сортировочные процессы. Сортировочную функцию аппарата Гольджи, как отмечалось выше, исследуют, пытаясь выяснить механизмы, с помощью которых его структуры узнают компоненты трех идущих через него потоков белков — лизосомальных ферментов, белков, предназначенных для обновления плазматической мембраны и секреторных продуктов. Однако конкретные детали этих процессов также все еще далеки от окончательного выяснения.

Столь же сложным представляется вопрос о ранних этапах сортировки синтезированных белков в эндоплазматической сети. Так, например, существует ряд белков, которые отвечают за процессы, происходящие в полости цистерны ЭПС — образование дисульфидных мостиков (изомеразы дисульфидных связей), правильную укладку белковой молекулы (BiP — см. выше) и т. д. Эти белки должны каким-то образом удерживаться в полости цистерны, а не транспортироваться в аппарат Гольджи с общим потоком синтезированных белков. У остающихся в ЭПС белков на N-конце имеется специальная сигнальная последовательность из четырех аминокислот (retention signal — сигнал удержания); существует и рецептор, узнающий эту последовательность и встроенный в мембрану ЭПС. На основании последних экспериментальных данных выдвинуто предположение о существовании так называемой цистерны спасения — специального компартмента, расположенного в непосредственной близости к ЭПС на пути к аппарату Гольджи. Если комплекс белков типа BiP с рецептором в составе транспортного пузырька покидает ЭПС, то путь к аппарату Гольджи им преграждает цистерна спасения. Происходит слияние транспортного пузырька с цистерной и диссоциация комплекса рецептор—лиганд; затем вновь образовавшийся транспортный пузырек покидает цистерну спасения и возвращается в ЭПС. Пузырьки же, несущие прочие белки, отшнуровываются от цистерны спасения и продолжают путь к аппарату Гольджи. Таким образом, между цистерной спасения и ЭПС постоянно циркулируют транспортные пузырьки, возвращающие в ЭПС белки, которые должны функционировать в полости ее цистерн.

Естественно, что для окончательного разрешения всех этих вопросов нужны дальнейшие исследования на новом методическом уровне и на широком круге объектов.

Проведенный краткий обзор истории становления и современного состояния проблемы взаимодействия мембранных орга-



органов цитоплазмы и поверхностного аппарата показывает, насколько быстро менялись эти представления на протяжении последних десятилетий. На смену распространенным ранее взглядам о «текучем» динамичном характере взаимопревращений эндо- и экзомембран пришли представления о стабильной и дифференцированной организации мембранных органоидов и наличии сложной транспортной рециклирующей системы для связи этих органоидов между собой и с мембраной поверхностного аппарата. Вместе с тем, в формируемой сейчас концепции организации метаболического аппарата цитоплазмы находят отражения и представления о единстве всех мембранных структур и пластичности (как филогенетической, так и функциональной) этой системы.



## ЯДЕРНЫЙ АППАРАТ

## 4.1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Биологическое значение ядерного аппарата определяется его главным компонентом — гигантскими молекулами ДНК, способными к репликации и транскрипции. Эти свойства лежат в основе важнейших функций ядерного аппарата любой клетки: 1) удвоения наследственной информации и передачи ее в ряду клеточных поколений; 2) регулируемой транскрипции участков молекул ДНК и транспорта синтезируемой РНК в цитоплазму клеток.

По характеру организации ядерного аппарата все клетки подразделяются на три группы: прокариотные, мезокариотные и эукариотные. Клетки прокариот не имеют ядерной оболочки; их кольцевая молекула ДНК реплицируется по унирепликонному типу, транскрипция идет по моноцистронному принципу, а ее регуляция — преимущественно по принципу положительной и отрицательной обратной связи.

Клетки эукариот, напротив, отличаются наличием сложного поверхностного аппарата ядра и мультирепликонным типом репликации молекул ДНК. Укладка ДНК в хромосомы осуществляется с помощью комплекса белков-гистонов. При прохождении клетками фаз цикла репродукции происходят закономерные изменения упаковки ДНК.

Мезокариотные клетки по организации ядерного аппарата занимают как бы промежуточное положение между прокариотными и эукариотными клетками. У мезокариот, как и у эукариот, имеется хорошо развитый поверхностный аппарат ядра. Укладка в хромосомы ДНК мезокариот существенно отличается от организации ДНП у эукариотных клеток. Механизмы репликации и транскрипции у мезокариот практически не выяснены.

В ядерном аппарате (рис. 66) эукариотных клеток можно выделить ряд субсистем, центральное место среди которых занимает совокупность интерфазных хромосом — хроматин, или



ДНП. Другой важной субсистемой ядерного аппарата является матрикс — «скелет» ядра, представляющий собой комплекс фибриллярных белков, который обеспечивает структурную организацию всех компонентов ядра и участвует в регуляции процессов репликации, транскрипции, созревания продуктов транскрипции (процессинге) и их выведении в цитоплазму.



Рис. 66. Интерфазное ядро эукариотной клетки.

1 — поверхностный аппарат ядра; 2 — наружная и 3 — внутренняя мембраны, разделенные перинуклеарным пространством; 4 — плотная пластинка; 5 — поровый комплекс; 6 — рибосомы; 7, 8 — участки гетеро- (7) и эухроматина (8); 9 — структуры ядерного матрикса; 10 — РНП-частицы; 11 — ядрышко; 12 — околоядрышковый гетерохроматин.

Еще одна субсистема — это поверхностный аппарат ядра, в состав которого входит ядерная оболочка с поровыми комплексами и субмембранная плотная пластинка, или ламина.



Наконец, последней субсистемой ядерного аппарата является карิโอплазма — аналогичная гиалоплазме бесструктурная фаза, создающая специфическое для ядерных структур микроокружение, что обеспечивает возможность их нормального функционирования. Через систему поровых комплексов и мембран ядерной оболочки карิโอплазма постоянно взаимодействует с гиалоплазмой.

## 4.2. ПОВЕРХНОСТНЫЙ АППАРАТ ЯДРА

### 4.2.1. ЯДЕРНАЯ ОБОЛОЧКА

Наличие на поверхности ядра мембраноподобных структур отмечали еще в 1833 г. Затем последовали длительные дискуссии о реальности ядерной оболочки, но уже к 1880 г. ее существование не вызывало сомнений. Постулировалось и наличие в оболочке отверстий, или пор. Глубокое изучение морфологии этой и других частей поверхностного аппарата стало возможным только в электронно-микроскопическую эру. Биохимический анализ этой системы был длительное время затруднен из-за отсутствия надежных методов выделения чистых фракций отдельных субсистем поверхностного аппарата ядра.

Ядерная оболочка является специализированной частью общей мембранной системы цитоплазмы. Она образована уплощенными цистернами и имеет соответственно наружную и внутреннюю мембраны и перинуклеарное пространство (рис. 66). Наружная мембрана ядерной оболочки переходит во внутреннюю в области ядерных пор. В этих участках располагаются белковые структуры порового комплекса, представленные системой упорядоченно ориентированных глобул. Внутреннюю мембрану ядерной оболочки на всем протяжении выстилает плотная пластинка (см. ниже), находящаяся в тесной структурной связи с белковыми глобулами порового комплекса.

Основное биологическое значение поверхностного аппарата ядра эукариотных клеток заключается в обеспечении регулируемого двустороннего взаимодействия ядра и цитоплазмы. Это взаимодействие осуществляется и через систему поровых комплексов, и за счет функциональной и структурной связи мембранных компонентов ядерной оболочки с мембранными структурами метаболического аппарата цитоплазмы. Таким образом, ядерная оболочка обеспечивает и компартментализацию ядерного аппарата, и его связь с мембранными органоидами цитоплазмы: наружная мембрана ядерной оболочки непосредственно переходит в мембраны эндоплазматической сети и перинуклеарное пространство оказывается связанным с полостью каналов и цистерн ЭПС (рис. 67).



Помимо таких постоянных структурных отношений во многих клетках наблюдаются и временные связи цистерн ядерной оболочки с аппаратом Гольджи, который часто локализуется в околоядерной области. Эти временные динамические связи чаще всего реализуются путем формирования транспортных пузырьков, отделяющихся от наружной мембраны ядерной оболочки и встраивающихся в цистерны Гольджи. Возможны и обратные отношения, например, аппарат Гольджи может принимать участие в формировании цистерн ядерной оболочки. Многие исследователи приписывают эту роль аппарату Гольджи при новообразовании ядерной оболочки после митоза или, по крайней мере, при экспериментальных нарушениях постмитотической сборки мембран ядерной оболочки.

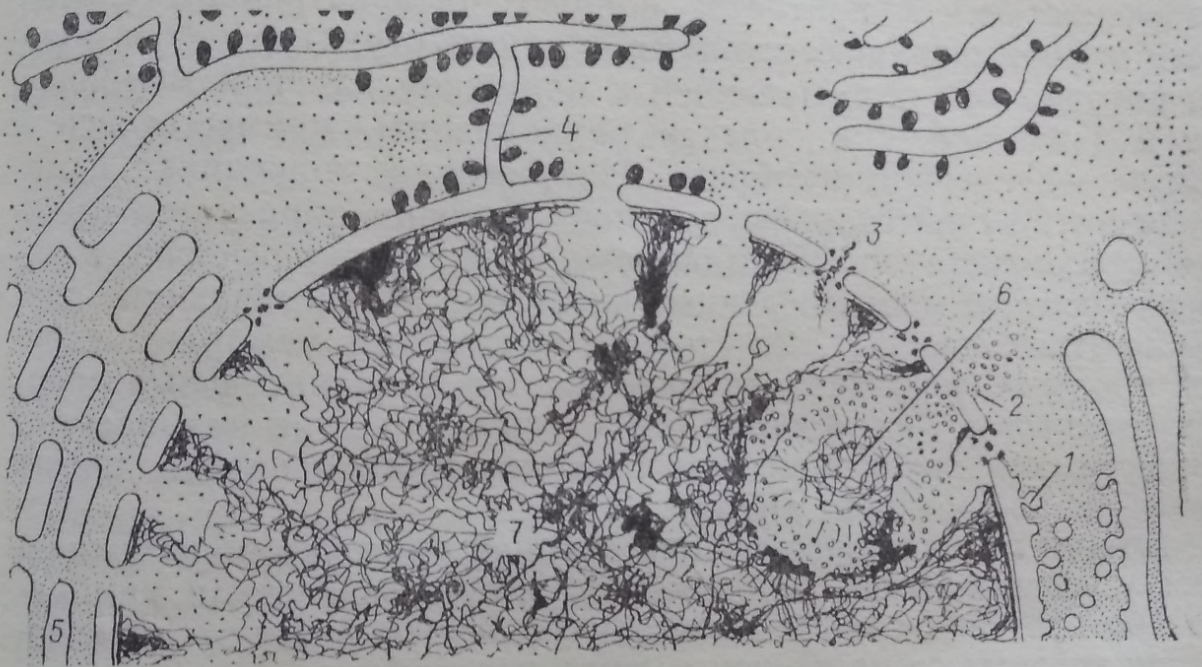


Рис. 67. Структурные взаимоотношения между поверхностным аппаратом ядра и рабочим аппаратом цитоплазмы.

1 — блеббинг наружной мембраны ядерной оболочки в направлении цистерн аппарата Гольджи; 2 — временная локальная разборка ядерной оболочки в области ядрышка (возможный механизм транспорта субъединиц рибосом); 3 — прохождение частицы РНП через центральную глобулу порового комплекса; 4 — структурный переход наружной мембраны ядерной оболочки в мембраны ЭПС; 5 — поровые пластинки в цитоплазме клеток; 6 — ядрышко; 7 — ДНП.

Временные связи ядра и цитоплазмы могут, по-видимому, осуществляться и путем локального разрушения ядерной оболочки; это обнаруживается, например, в нейронах млекопитающих. Предполагают, что подобным способом может происходить и транспорт субъединиц рибосом из ядра в цитоплазму. Что касается тонкой морфологической организации мембран



ядерной оболочки, то она принципиально не отличается от аналогичной организации других мембран метаболического аппарата цитоплазмы. В наружной мембране ядерной оболочки могут быть локализованы специфические белки для рецепции и транспортировки синтезируемых на рибосомах гистонов и, возможно, рецепторы к некоторым гормонам; удалось здесь обнаружить и ряд ферментов. Специфическими для внутренней мембраны ядерной оболочки являются интегральные белки, контактирующие с компонентами плотной пластинки; в области ядерных пор на границе между наружной и внутренней мембранами также локализуются особые интегральные белки (см. ниже).

Для понимания организации ядерной оболочки существенный интерес представляют ее модификации в клетках протистов. (Как будет видно из последующих примеров, эта часть поверхностного аппарата ядра вообще характеризуется большой пластичностью.) У протистов широко распространена способность к формированию сложных опорных структур как в области цитоплазмы, примыкающей к наружной ядерной мембране, так и (еще чаще) в области кариоплазмы, примыкающей к внутренней ядерной мембране. Например, у солнечника с цитоплазматической стороны ядерной оболочки образуется сложная гетерогенная скелетная система. Она служит основой, к которой крепятся многочисленные аксономы, обеспечивающие движение этих животных. Со стороны внутренней мембраны ядерной оболочки у солнечника развиваются дополнительные опорные структуры. Аналогичные структуры в виде так называемого сотового слоя характерны для поверхностного аппарата других протистов, в частности амёб.

Другой вариант организации ядерной оболочки обнаруживается у гипермастигид. В их клетках наружная ядерная мембрана образует правильные выросты грушевидной формы, в основании которых сосредоточены многочисленные рибосомы; в дистальных расширенных участках перинуклеарного пространства накапливаются белки, синтезируемые, по-видимому, на этих рибосомах.

Для протистов вообще характерно образование складок ядерной оболочки. Так, у некоторых грегариин ядерные мембраны образуют многочисленные трубчатые или пластинчатые выпячивания. В результате этого общая поверхность взаимодействия ядра и цитоплазмы возрастает в сотни раз. Тенденция к увеличению площади поверхностного аппарата ядра наблюдается и при специализации клеток многоклеточных животных. Однако здесь оно достигается чаще всего за счет выпячиваний ядерной оболочки. В этих случаях увеличение взаимодействующих поверхностей значительно меньше, чем у трофозоитов грегариин.



#### 4.2.2. ПОРОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ И ПЛОТНАЯ ПЛАСТИНКА

Субмембранная плотная пластинка (ламина), выстилающая внутреннюю ядерную мембрану, и связанные с ней сложные белковые структуры — поровые комплексы — представляют собой специализированную часть ядерного матрикса. Эта часть поверхностного аппарата ядра выполняет преимущественно две функции: обеспечивает взаимосвязь ядра и цитоплазмы, регулируя контакт карио- и гиалоплазмы в области ядерных пор, и играет структурноорганизующую роль в отношении интерфазных хромосом, определенные участки которых связаны с плотной пластинкой.

Размеры типичных поровых комплексов у большинства эукариот постоянны для данного типа клеток и составляют от 60 до 120 нм в диаметре; поровые комплексы характеризуются отчетливо выраженной симметрией.

Поровый комплекс, как правило, представляет собой два кольца из восьми белковых глобул (или гранул) диаметром от 10 до 25 нм, расположенных по периферии отверстия в ядерной оболочке — в области слияния наружной и внутренней мембран (рис. 68). Иногда имеется и третье кольцо, расположенное между двумя другими. В центре поры находится гранула, связанная с периферическими глобулами тонкими фибриллами. По мнению многих исследователей, в центральной грануле расположен канал, через который в цитоплазму транспортируются высокомолекулярные соединения — белки и РНК. Морфологические и биохимические исследования 60—70-х годов позволили предположить, что поровые комплексы — это структуры, которые обеспечивают не только транспортировку и РНК, но и основные этапы ее созревания. В пользу такого предположения свидетельствовали цитологические наблюдения, регистрирующие резкие изменения морфологии гранул и других образований, локализованных в ядре и транспортируемых через ядерные поры.

Однозначно решить вопрос о функциональном значении поровых комплексов достаточно сложно из-за варьирования этой структуры в разных эукариотных клетках. Особенно много модификаций поровых комплексов наблюдается в клетках протистов. Так, иногда может не быть центральной гранулы, причем в ядрах некоторых клеток иногда сосуществуют поровые комплексы с центральной гранулой и без нее. Есть примеры слабого развития или даже отсутствия периферических гранул порового комплекса. Наконец, возможна не глобулярная, а какая-либо иная структура его элементов. В частности, они могут иметь вид цилиндров или трубочек, сохраняя обычные для поровых комплексов взаимоотношения с плотной пластинкой и мембранами ядерной оболочки. В связи с этим существовало



мнение о том, что центральная глобула представляет собой не постоянную структуру, а транспортируемые через поры рибонуклеопротеиды.

В исследованиях 60—70-х годов доказывалась и очень тесная структурная связь поровых комплексов с плотной пластинкой.

Такая связь была продемонстрирована, в частности, в опытах с избирательным удалением мембран ядерной оболочки. Оказалось, что при действии детергентов можно полностью удалить ядерную оболочку, при этом форма ядра сохраняется. Таким образом, основную роль в скелетоорганизующей функции поверхностного аппарата играет именно плотная пластинка. Кроме того, эти результаты пытались использовать для доказательства отсутствия непосредственной структурной связи между элементами порового комплекса и мембранами ядерной оболочки и, наоборот, наличия такой связи между глобулами порового комплекса и белками плотной пластинки. При удалении ядерной оболочки поровые комплексы остаются связанными с плотной пластинкой.

Выяснение химического состава поровых комплексов осложнялось трудностями отделения от компонентов плотной пластинки, т. е. получения чистых фракций. В биохимических исследованиях использовались как объекты, богатые поровыми комплексами со слабо развитой пластинкой, так и бедные пора́ми и с хорошо развитой пластинкой. Белковый состав поровых комплексов до сих пор полностью не выяснен. Среди компонентов поровых комплексов охарактеризованы (выделены), например, гликопротеиды 190 и 62 кДа, связывающие периферические грану-

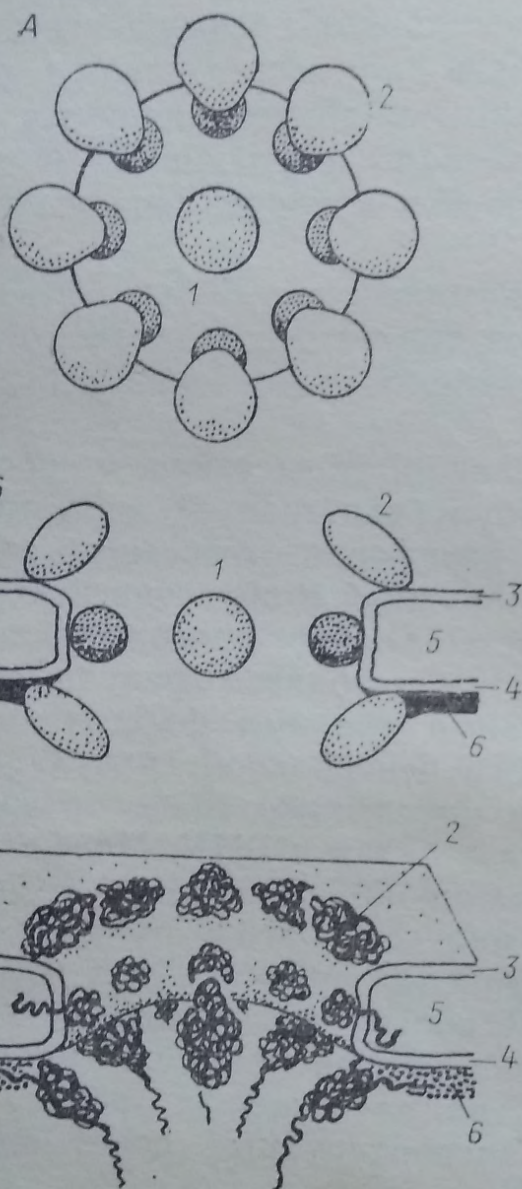


Рис. 68. Организация порового комплекса.

А — вид сверху; Б — вид на срезе, В — детали организации комплекса. 1 — центральная и 2 — периферические белковые глобулы; 3 — наружная и 4 — внутренняя мембраны ядерной оболочки; 5 — перинуклеарное пространство; 6 — плотная пластинка.

витыми плотными пластинками, так и бедные пора́ми и с хорошо развитой пластинкой. Белковый состав поровых комплексов до сих пор полностью не выяснен. Среди компонентов поровых комплексов охарактеризованы (выделены), например, глико-



лы с наружной и внутренней ядерной мембраной, т. е. как бы фиксирующие поровый комплекс в ядерной оболочке. В состав поровых комплексов входит также группа из восьми полипептидов — нуклеопоринов — молекулярной массой 45—210 кДа, представляющих собой особый класс гликопротеидов, содержащих N-ацетилглюкозамин, связанный O-гликозидной связью с серином полипептида. Обработка ядер лектином WGA и моноклональными антителами на углеводный остаток нуклеопоринов показала, что эти белки локализованы в периферических глобулах ядерной поры.

Многочисленные факты свидетельствуют об изменении количества ядерных пор, а значит, и поровых комплексов в разные периоды жизнедеятельности клетки, в разном функциональном состоянии и при экспериментальных воздействиях. Как правило, чем более активен ядерный аппарат клетки, тем больше пор обнаруживается в ядерной оболочке. Количество поровых комплексов на поверхности ядра может варьировать от  $10^2$  до  $5 \cdot 10^7$  (от 1—3 до 50—60 на квадратный микрон); изменяется и плотность их расположения (особенно в процессе дифференцировки клетки и в ответ на разные воздействия). При новообразовании поровых комплексов существенную роль играют интегральные белки мембраны, расположенные в местах контакта наружной и внутренней мембран ядерной оболочки.

Через поровые комплексы осуществляется транспорт различных соединений из ядра в цитоплазму (все типы РНК) и из цитоплазмы в ядро (различные белки). Процессы, происходящие в поровых комплексах с транспортируемыми продуктами (например, РНП), далеки от окончательного выяснения. Созревание иРНК и рРНК у эукариот происходит в основном в ядерном матриксе, хотя не исключено, что какие-то этапы процессинга могут проходить и в области поры. Так, у дрожжей в поровых комплексах обнаружены ферменты, способные осуществлять процессинг РНК. В ядерных порах, по-видимому, происходит также замена одних белков, связанных с иРНК, на другие (см. ниже).

Низкомолекулярные соединения свободно диффундируют через пору; так, полипептиды молекулярной массой до 30—35 кДа легко проходят в ядро; диффузия овальбумина (43 кДа) уже затруднена, а бычий альбумин (68 кДа) не может пройти барьер порового комплекса. Для транспортировки в ядро крупных молекулярных белков они должны иметь определенную сигнальную последовательность — сигнал ядерной локализации.

Закономерности ядерно-цитоплазматического транспорта исследованы в модельных опытах на ооцитах ксенопуса с помощью белка нуклеоплазмина, меченного коллоидным золотом. Этот пентамерный белок (165 кДа) обнаружен в ядрах (нуклеоплазме) ооцитов амфибий, где, по-видимому, играет существенную роль в сборке нуклеосом.



Инъецированный в цитоплазму ооцита меченый нуклеоплазмин быстро аккумулируется в ядре, проходя через канал центральной глобулы порового комплекса. За транспорт белка через ядерную оболочку ответственны небольшие линейные концевые участки мономеров нуклеоплазмина; их удаление препятствует переходу белка в ядро — пентамеры, лишенные концевых участков, оставались в цитоплазме, а изолированные концевые участки были способны проникать в ядро (рис. 69). Если сшить такой концевой участок с любым белком, в норме не локализуемом в ядре, например галактозидазой, то последний транспортируется через ядерную оболочку в кариоплазму. На С-концевых участках мономеров нуклеоплазмина имеется сигнал ядерной локализации — определенная последовательность аминокислот. В большом Т-антигене вируса полиомы также выявлена подобная сигнальная последовательность. Гомологичный сигнал содержится и в молекуле большого Т-антигена вируса SV40, причем в этом случае принципиальное значение для транслокации белка в ядро имеет Lys 128; точечная мутация — замена лизина в этом положении на другую аминокислоту — блокирует транспорт, и белок накапливается в цитоплазме.

Процесс транслокации через ядерную пору начинается, вероятно, с ассоциации транспортируемой молекулы с рецепторами порового комплекса. На ооцитах ксенопуса показано, что обработка лектином WGA препятствует переходу нуклеоплазмина в ядро, в то время как процессы пассивной диффузии нечувствительны к действию лектина. Как показал электрофоретический анализ, лектины связываются с гликопротеином 63—65 кДа. Добавление N-ацетилглюкозамина — вещества, специфически связывающегося с WGA, снимает лектиновый блок транспортных процессов. Моноклональные антитела к ряду гликопротеидов порового комплекса (в том числе к нуклеопоринам) также ингибируют транспорт.

Для переноса в ядро высокомолекулярных соединений необходима энергия АТФ, иначе «кариофильные» белки только связываются с поровыми комплексами, но в ядро не проникают. В опытах с меченым коллоидным золотом нуклеоплазмином были выяснены интересные детали процесса транслокации белков в ядро. Вначале нуклеоплазмин концентрируется вокруг ядра, ассоциируясь с 3-нм фибриллами, связывающими поровый комплекс с цито- и кариоплазмой; они, по-видимому, фиксируют транспортируемые белки на ядерной оболочке. (Заманчиво было бы предположить, что эти фибриллы относятся к тонким филаментам цитоскелета и играют связующую роль между основными цитоскелетными системами и элементами ядерного матрикса). Вслед за этим уже происходит энергозависимая транслокация белка через пору.

Таким образом, полипептиды, по-видимому, транспортируются в ядро через канал центральной глобулы; низкомолекуляр-



ные — посредством диффузии, а транспорт высокомолекулярных соединений представляет собой двухэтапный энергозависимый процесс, требующий взаимодействия сигнальной последовательности транспортирующегося белка (сигнала ядерной локализации) с рецепторами порового комплекса.

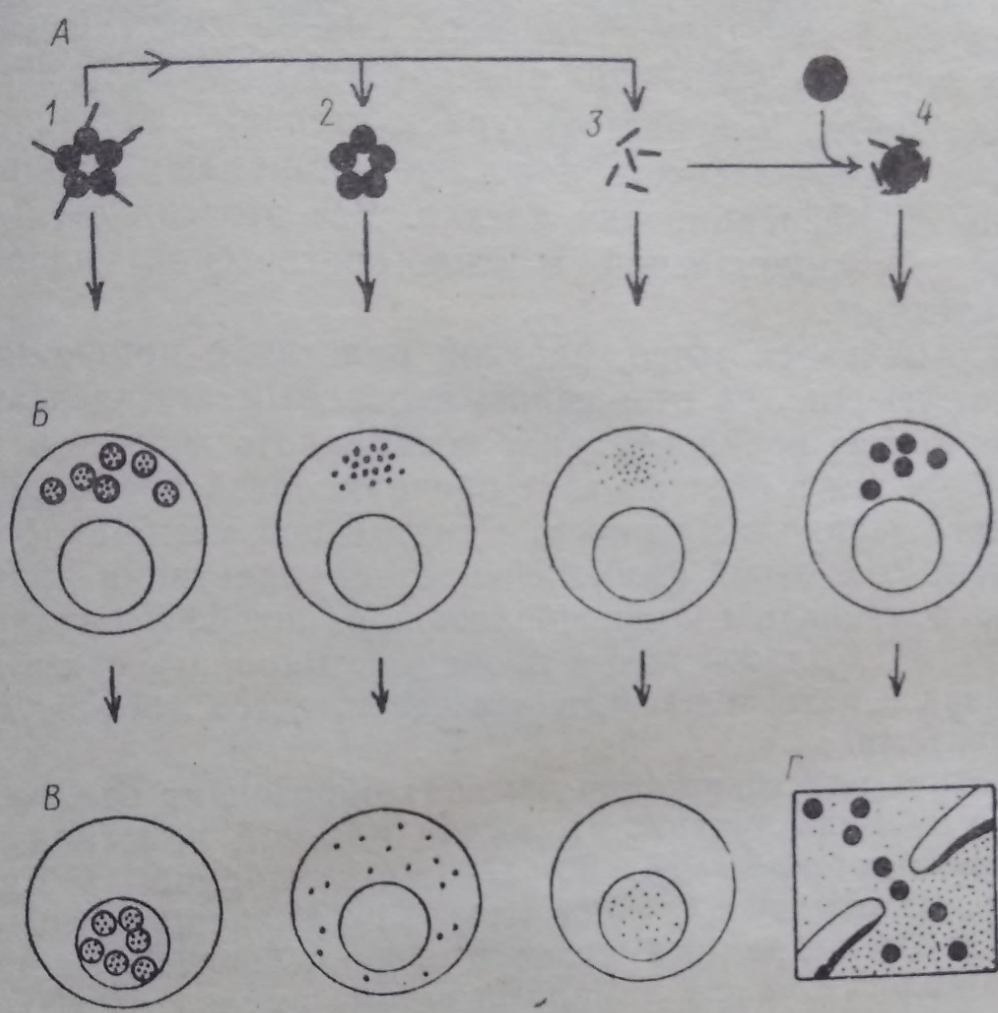


Рис. 69. Схема опытов по транслокации белка нуклеоплазмينا в ядро ооцитов ксенопуса (по: Alberts e. a., 1989).

A — инъецируемый материал; B, B' — его локализация в клетке сразу (B) и через некоторое время (B') после инъекции; Г — прохождение маркированного белка через ядерную пору. 1 — нативный пентамер нуклеоплазмينا; 2 — пентамер без концевых участков молекул; 3 — изолированные концевые участки, связанные с частицей коллоидного золота.

Поровые комплексы представляют собой сложную надмолекулярную структуру — своеобразный органонд ядерного аппарата. Они обладают как собственным рецепторным аппаратом, сосредоточенным и на наружной, и на внутренней поверхности ядерной оболочки (по-видимому, в периферических гранулах), так и аппаратом для регуляции направления, способа и интенсивности транспорта через центральную глобулу порового комплекса. Однако тонкие механизмы регулируемого двустороннего транспорта между ядром и цитоплазмой все еще остаются в значительной мере невыясненными.



Загадочной остается и функция особых структур — поровых пластинок, или annulate lamellae, которые представляют собой стопки мембран с поровыми комплексами и обнаружены как в цитоплазме, так и в ядерном аппарате клеток многих животных.

Относительно хорошо изучена другая важнейшая структура поверхностного аппарата ядра — плотная пластинка, или ламина. Степень ее развития может варьировать в широких пределах: от едва заметной (толщиной 20—80 нм) субмембранной сети, до мощного (250—300 нм) сотового слоя ядра у некоторых простейших. Ультраструктура и степень развития плотной пластинки может зависеть и от функционального состояния, и от стадии дифференцировки клетки. Все это свидетельствует о большой функциональной и филогенетической пластичности этой структуры.

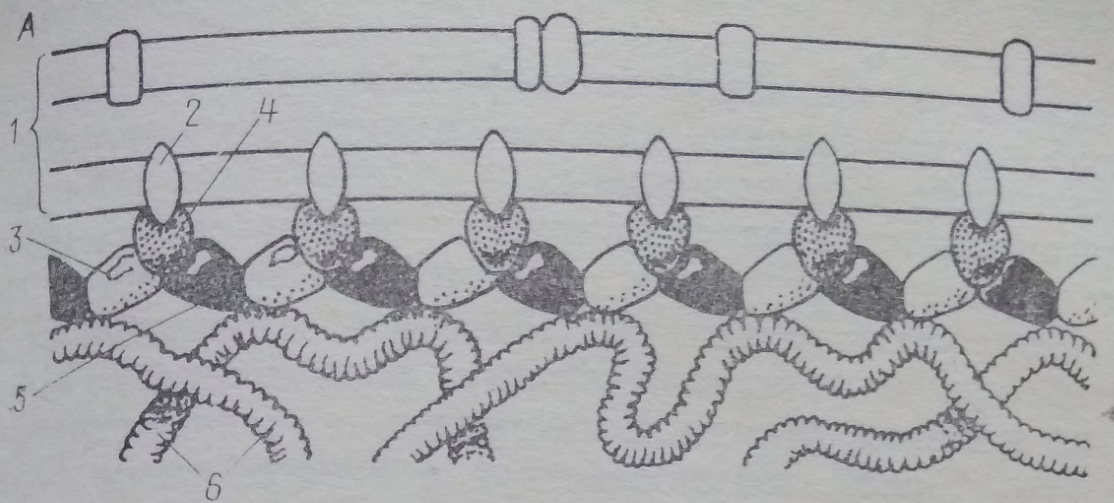
Как отмечалось выше, плотной пластинке приписывали организующую роль по отношению к поровым комплексам, однако в настоящее время начинает преобладать мнение о том, что она прежде всего обеспечивает прочную связь периферического, да и всего ядерного матрикса, с внутренней мембраной ядерной оболочки. Еще одной функцией плотной пластинки является ее участие в упорядочении расположения интерфазных хромосом (рис. 70, А). Удалось также продемонстрировать связь плотной пластинки с цитоскелетом, в частности, с его промежуточными филаментами.

Плотная пластинка (или ламина) образована белками ламинами; у высших эукариот в состав плотной пластинки входят ламины трех типов — А, В, С — молекулярной массой 62—72 кДа. Ламин А и С очень близки по аминокислотным последовательностям, ламин В незначительно отличается от них. Процент гомологии между ламинами весьма высок; эти белки дают перекрестные иммунологические реакции.

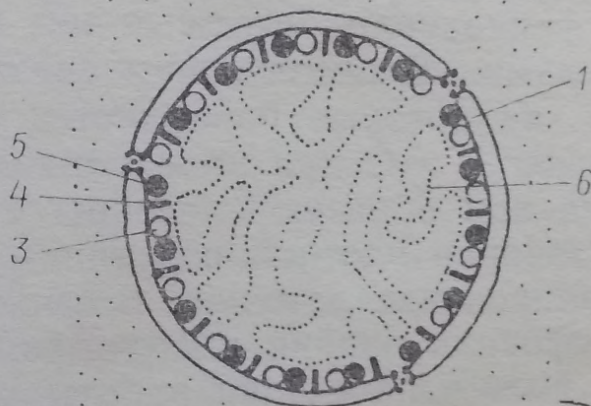
Ламинны высококонсервативные белки. В эритроцитах птиц плотную пластинку образуют два ламина — А и В; в тканях ксенопуса — пять; у насекомых (дрозофила), дрожжей и в ооцитах моллюсков — один (ламин В). Плотная пластинка может формироваться из ламин одного, двух или трех типов без видимых изменений структуры.

У высших эукариот ламинны А, В и С обычно представлены в равных количествах, хотя некоторые данные указывают на то, что их соотношение может варьировать в зависимости от функционального состояния клетки и ее метаболической активности. Существует большое сходство между ламинами плотной пластинки ядерной оболочки и белками промежуточных филаментов цитоскелета. Они близки по первичной структуре; особенно высокий процент гомологии по аминокислотным последовательностям обнаруживается между ламинами и виментином, десмином, глиальным фибриллярным кислым белком и основными кератинами.





Б



Г

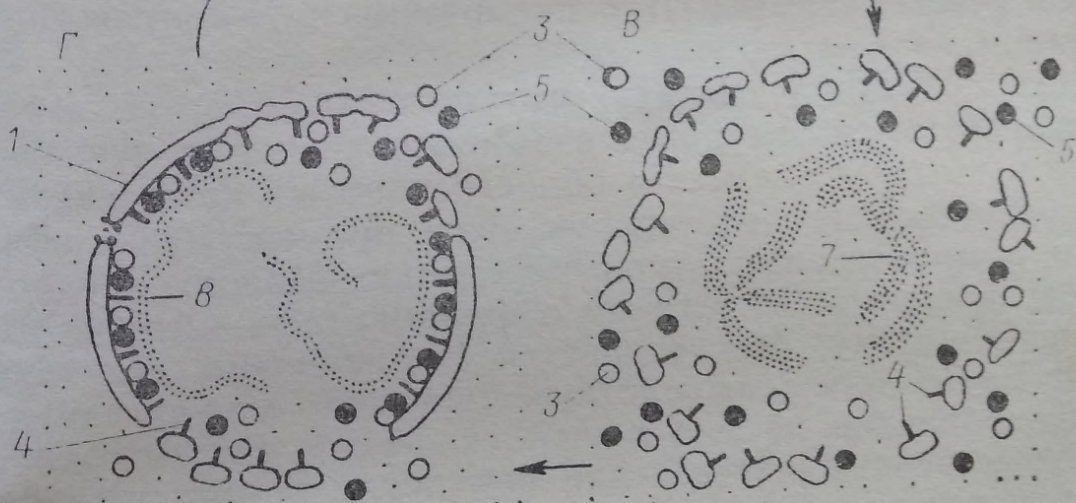


Рис. 70. Организация плотной пластинки.

А — связь плотной пластинки с ядерной оболочкой и хроматином; Б—Г — реорганизация плотной пластинки в ходе клеточного цикла: Б — интерфаза, В — поздняя профаза и Г — телофаза. 1 — ядерная оболочка; 2 — интегральный белок мембраны; 3—5 — ламины А(3), В(4) и С(5); 6 — хроматин; 7 — конденсированные и 8 — деконденсировавшиеся хромосомы.

Особенностью вторичной структуры ламинов (как и белков промежуточных филаментов) является наличие  $\alpha$ -спиральных участков, разделенных линейными перемычками — линкерами; при взаимодействии двух соседних молекул эти участки обра-



зуют суперспираль (coiled coil), закручиваясь один вокруг другого.

В отличие от промежуточных филаментов у ламинов  $\alpha$ -спиральные участки гораздо длиннее, а линкеры занимают очень незначительную часть молекулы.

Олигомеры ламинов формируют плотную сеть, напоминающую спектриновую структуру субмембраны эритроцита. На овочитах ксенопуса показано, что ламины объединяются в ортогональную сеть с антипараллельным расположением молекул. Один из ламинов (ламин В) вступает в тесную структурную связь с мембраной, взаимодействуя с интегральным белком — рецептором к ламину В. Не исключено также и встраивание в мембрану гидрофобного участка ламина В. Надо отметить, что в молекуле ламина В имеются протяженные последовательно сти гидрофобных аминокислот, которых нет в ламинах А и С. Во время митоза ламин В оказывается связанным с мембранными пузырьками, на которые распадается ядерная оболочка (рис. 70, Б). Ламины А и С при этом равномерно распределяются в цитоплазме или образуют частицы с константой седиментации 4,5 S. Разборке плотной пластинки при митозе предшествует фосфорилирование ламинов. Возможно, что процессы их частичного фосфорилирования и дефосфорилирования играют существенную роль в регуляции работы ядерного аппарата в интерфазе. *In vitro* удалось продемонстрировать связь С-концевого участка ламина В с анкирином и N-концевого — с виментином.

Есть основания считать, что плотная пластинка способна осуществлять структурные взаимоотношения с цитоскелетом. Так, в некоторых клетках в области поровых комплексов удается наблюдать непосредственную связь промежуточных филаментов и компонентов плотной пластинки. Можно предполагать, что связь плотной пластинки с филаментами цитоскелета также, по-видимому, обеспечивается N-концевыми участками ламинов В. По сути дела, плотную пластинку можно считать специализированной частью общей скелетной системы клетки.

Существенный интерес для выяснения конкретных функций поверхностного аппарата ядра представляет вопрос о взаимосвязи плотной пластинки с ДНК интерфазных хромосом. Ранее таким связям приписывалось доминирующее значение в структурной организации интерфазных хромосом и особенно в регуляции репликации ДНК. К настоящему времени выяснено, что роль их в этих процессах значительно скромнее: относительно слабы связи интерфазных хромосом с ламинами плотной пластинки; значительно прочнее связана ДНК с белками интерфазного ядерного матрикса; эти связи имеют гораздо большее значение в упаковке ДНП и в регуляции репликации ДНК.



### 4.3. ИНТЕРХРОМАТИНОВЫЙ ЯДЕРНЫЙ МАТРИКС

Представления о существовании интерхроматинового ядерного матрикса возникли еще до применения в цитологических исследованиях электронного микроскопа. Уже в 1942 г. в ядрах описывали мощную сеть остаточных белков после экстракции хроматина солевыми растворами. В известных сводках конца 50-х и начала 60-х годов она получила название остаточной гранулярно-фибриллярной сети РНП и рассматривалась наряду с хроматином как важная скелетно-регуляторная система ядерного аппарата. Однако к середине 60-х годов стали появляться скептические высказывания относительно реальности этой структуры, возможно, из-за отсутствия в то время строгих биохимических методов, позволяющих разделить негистоновые белки хроматина и белки ядерного матрикса. Тем не менее к середине 70-х годов накопилось достаточно данных, не позволяющих подвергать сомнению существование ядерного матрикса, и в настоящее время к этой системе ядерного аппарата принято относить структуры, остающиеся после обработки ядра рядом агентов (NaCl, детергентами, ДНКазой, РНКазой). При такой обработке из ядер клеток печени, например, извлекается по 99% ДНК, РНК, фосфолипидов и 90% белка. Остаточный компонент и представляет собой ядерный матрикс или нехроматиновые структуры ядерного аппарата; он состоит на 92,4% из белка, 1,1% — РНК, 0,1% — ДНК, 1% — фосфолипидов, 5,5% — углеводов. Определенные участки молекул ДНК и РНК образуют особенно тесные структурные и химические связи с белками ядерного матрикса и при специальной обработке извлекаются вместе с ними.

Ядерный матрикс образует следующие морфологические структуры: 1) периферическую сеть (плотную пластинку и поровые комплексы), 2) остаточную ядрышковую сеть, 3) гранулярно-фибриллярную интерхроматиновую сеть.

Избирательное удаление поверхностного аппарата ядра (оболочки и плотной пластинки с поровыми комплексами) не вызывает изменения формы ядра, сохраняющейся за счет остаточной сети ядерного матрикса. Более того, при проведении этой манипуляции с бластотрансформированными лимфоцитами и сегментоядерными лейкоцитами остаточная сеть сохраняет специфическую для каждого вида клеток форму (округлую для лимфоцитов и неправильную для зернистых лейкоцитов).

Эти данные, во-первых, еще раз доказывают реальность существования ядерного матрикса и, во-вторых, указывают на его скелетноорганизующую роль. На изолированном матриксе макронуклеуса тетрахимены показана его способность набухать или сжиматься при действии солевых растворов. На этом же объекте продемонстрированы однотипные изменения в морфоло-



гии ядрышек и ядрышкового матрикса при действии наркотиков.

Основным компонентом ядерного матрикса являются белковые фибриллы и гранулы РНП диаметром около 7 и 25 нм соответственно. Периферическая часть матрикса содержит плотно упакованные крупные гранулы и фибриллы, тесно контактирующие с ламиной. Фракция РНП наиболее гетерогенна по своему составу и «чувствительна» к различным методам выделения. Белковый состав матрикса также весьма гетерогенен; в отличие от эволюционно консервативных белков ламины среди полипептидов ядерного интерхроматинового матрикса обнаруживаются компоненты высокоспецифичные для каждого типа клеток. Молекулярная масса белков интерхроматинового матрикса в основном варьирует от 40—70 до 100—200 кДа. Некоторые из этих белков являются общими для матрикса интерфазных клеток и скаффолда митотических хромосом (см. ниже). Часть белков интерхроматинового ядерного матрикса обладает сродством к ДНК и РНК, обеспечивая их прикрепление к матриксу и регуляцию столь важных процессов как репликация и транскрипция (см. ниже).

Установленным фактом является и наличие в ядерном аппарате актина, ассоциирующегося с ядерным матриксом. В ядрах ооцитов ксенопуса он в основном представлен G-актином, однако, возможно, это связано со спецификой объекта. В ооцитах травяной лягушки обнаружены актиновые филаменты. Такие же структуры выявлены в ядерном матриксе амебы, слизевика и ряда других клеток. Существуют данные об участии актина в регуляции транскрипции хромосом типа ламповых щеток. Так, путем микроинъекции актинсвязывающих белков и антител к актину в ядро ооцита *Pleurodeles waltl* селективно ингибировали транскрипцию, происходящую с помощью РНК-полимеразы II. При этом наблюдалось уменьшение размеров петель и конденсация хроматина, а вблизи хромосом происходило формирование сети актиновых филаментов, тесно связанных с РНК-полимеразой II. Возможно, что регулирующая роль актина обусловлена его способностью к гель—золь переходам.

В препаратах ядерного матрикса выявляются обычно  $\beta$ - и  $\gamma$ -изоформы актина, однако в некоторых клетках в дополнение к ним имеется еще две его кислые модификации. Актин транспортируется в ядро при помощи особых актинсвязывающих белков.

Матрикс ядрышка представляет собой плотно упакованные 5—7-нм фибриллы с гранулами; в его состав входят преимущественно основные белки. Более подробно этот вопрос мы обсудим при рассмотрении процессов синтеза и созревания рибосомной РНК.



#### 4.4. ИНТЕРФАЗНЫЕ ХРОМОСОМЫ

Исследование хроматина в интерфазных ядрах началось еще в конце прошлого века. Однако морфологические методы позволили охарактеризовать интерфазные хромосомы, или хроматин, лишь в самом общем виде. Так, выделили следующие разновидности хроматина: деспирализованный, или деконденсированный, эухроматин и конденсированный гетерохроматин, который подразделяется на конститутивный и факультативный.

По этим представлениям, конститутивный гетерохроматин не может деконденсироваться и перейти в эухроматин, в то время как факультативный гетерохроматин обладает способностью к такого рода превращениям. Позднее было показано, что эухроматин содержит транскрибируемую ДНК. ДНК факультативного гетерохроматина, находясь в конденсированном состоянии, не транскрибируется. Естественно, что состав факультативного гетерохроматина и его относительное количество не одинаковы у клеток разных организмов, разных тканей одного организма и даже при различном уровне дифференциации клеток одного типа. Так, например, количество факультативного гетерохроматина резко уменьшается в ядрах лимфоцитов при бластотрансформации и, наоборот, резко увеличивается при дифференцировке ядерных эритроцитов позвоночных. Еще более наглядно проявляются подобные изменения при пересадке ядер дифференцированных клеток в яйцеклетку амфибий или при формировании гетерокарионов из эритроцитов и раковых клеток в культуре *in vitro*.

Анализ организации интерфазного хроматина в интактных ядрах электронно-микроскопическими методами дал довольно скромные результаты. В основной массе интерфазных хромосом при электронно-микроскопическом исследовании обнаруживались хаотично расположенные фибриллы разного диаметра. Их число, приходящееся на единицу площади, варьировало.

В углублений наших представлений о структурной организации интерфазных хромосом существенную роль сыграли многочисленные исследования, выполненные на политенных хромосомах клеток слюнных желез двукрылых насекомых (рис. 71) и особенно на хромосомах типа ламповых щеток (рис. 72). По внешнему виду эти хромосомы напоминают ершики для чистки керосиновых ламп. Хромосомы типа ламповых щеток формируются в яйцеклетках в профазе первого деления мейоза и состоят из участков спирализованного хроматина (так называемых хромомерных участков), петель деспирализованной ДНК и интерхромомерных участков ДНК, связывающих между собой хромомеры. Политенные хромосомы содержат многочисленные параллельно расположенные нити ДНК. Они так же, как и хромосомы типа ламповых щеток, состоят из спирализованных, плотно упакованных участков молекул ДНК — дисков и связывающих



их неспирализованных участков. Спирализованные, или хромомерные, участки способны деспирализовываться и образовывать петли — так называемые пуфы политенных хромосом.

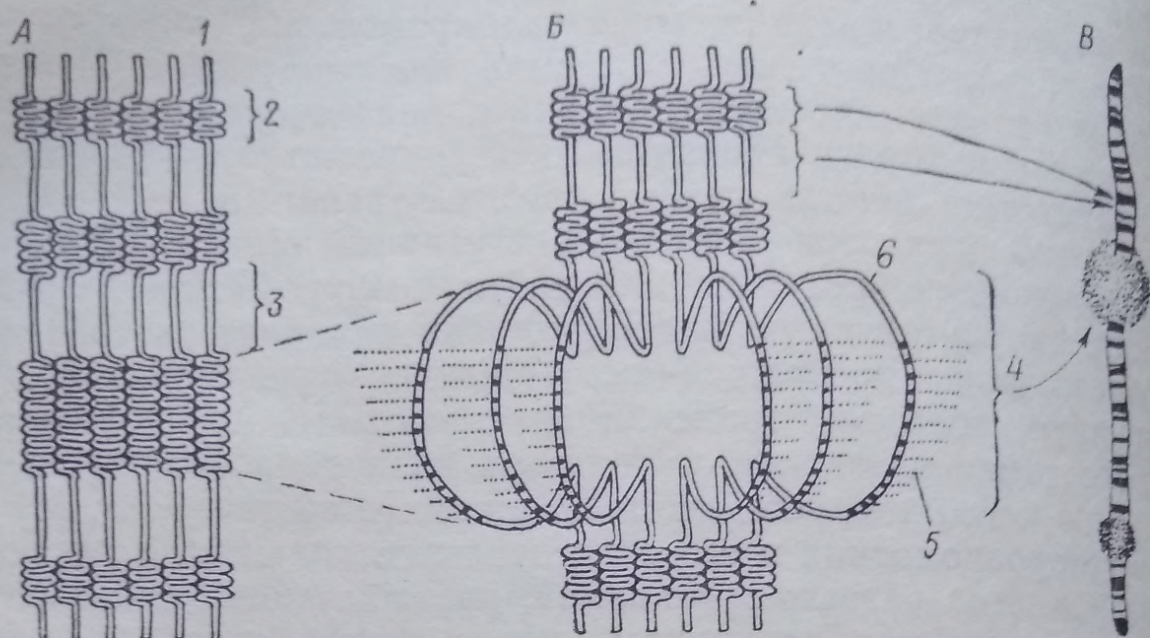


Рис. 71. Организация политенной хромосомы (по: Alberts e. a., 1989).

А — укладка хроматиновых нитей в хромосоме, Б — образование пуфа, В — вид в световом микроскопе. 1 — хроматиновая нить; 2 — хромомер с плотной упаковкой ДНК (диск). 3 — междисковый участок; 4 — пуф; 5 — РНК-транскрипт; 6 — петли ДНК, образующие пуф.

В пуфах политенных хромосом и на петлях хромосом типа ламповых щеток происходит интенсивная транскрипция.

Выводы, вытекающие из цитологического анализа хромосом этих двух типов, легли в основу представлений о хромомерном принципе организации хромосом. Суть их заключается в том, что в ДНК хромосом присутствуют хромомеры — участки временно конденсированной ДНК, которая не транскрибируется. Они могут деконденсироваться (деспирализоваться). Хромомер при переходе в активное, транскрибируемое состояние формирует петли из деконденсированной ДНК, на которых и протекает синтез РНК.

Параллельно с морфологическими широко проводились и разнообразные биохимические исследования хроматина, выделенного из эукариотных клеток. Особенно интенсивно такие работы развернулись начиная с 60-х годов. Прежде всего были установлены количественные соотношения ДНК и белков в ДНП и дана качественная характеристика этих основных образующих ДНП соединений. Кроме того, из хроматина было выделено небольшое количество РНК (около 1%), которой отдельные исследователи приписывали существенную роль в регуляции транскрипции.

При биохимическом анализе ДНК эукариотных клеток выделяются три фракции, содержащие уникальные, умеренно по-



вторяющиеся и высоко повторяющиеся последовательности нуклеотидных пар. Они представлены в гигантской молекуле ДНК, образующей хромосому, соответственно один или несколько раз (уникальные последовательности или уникалы), десятками или сотнями копий (умеренные повторы) и сотнями тысяч — иногда до миллионов копий (множественные повторы). Умеренные повторы длиной от нескольких сотен до нескольких тысяч нуклеотидных пар (н. п) составляют 10—15% генома у разных видов эукариот. Множественные повторы состоят из коротких нуклеотидных последовательностей (до нескольких сотен).

Участки ДНК с уникальными последовательностями нуклеотидов содержат информацию для синтеза разнообразных белковых молекул. Среди продуктов, кодируемых умеренно повторяющимися последовательностями, находятся рибосомные и транспортные РНК, а также информационные РНК для всех фракций гистонов. Высоко повторяющиеся последовательности ДНК отличаются от остальной ДНК ядра составом оснований (эти последовательности обогащены АТ- или ГЦ-парами). Это так называемая сателлитная ДНК. Она входит в состав конститутивно-

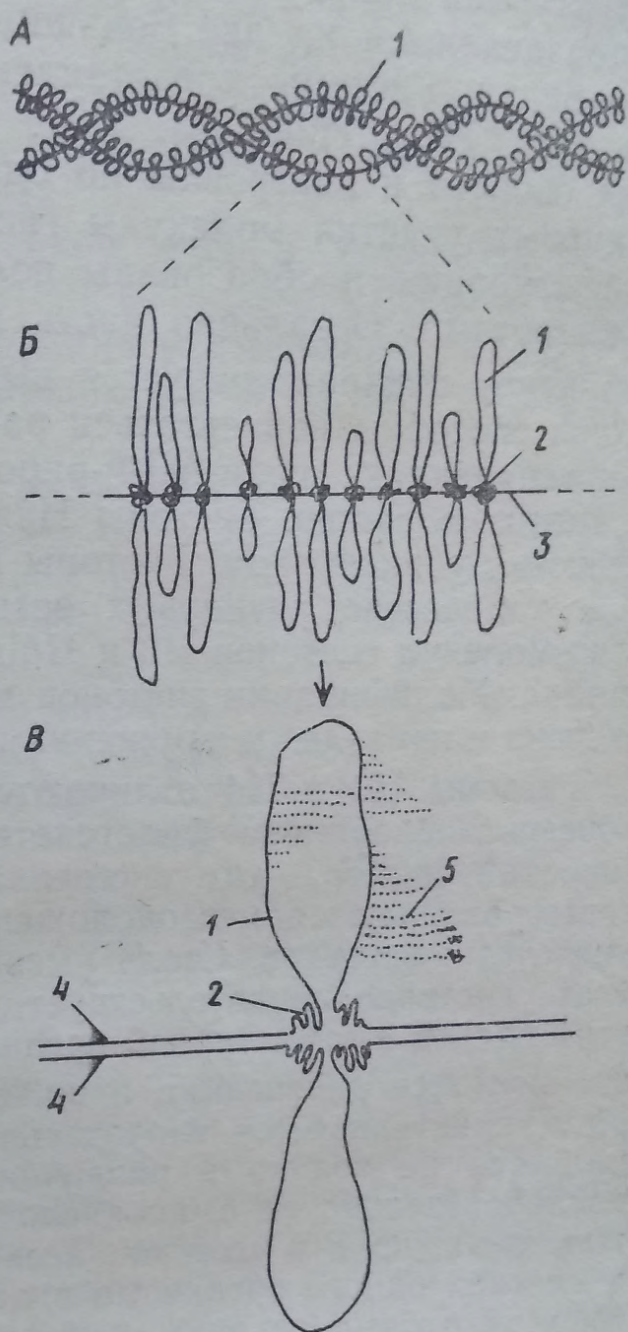


Рис. 72. Хромосома типа ламповых щеток (по: Alberts e. a., 1989).

4 — спаренные хромосомы, Б — участок хромосомы, В — то же увеличено. 1 — петли ДНК; 2 — хромомер; 3 — ось хромосомы; 4 — нить ДНК; 5 — РНК-транскрипт.

го гетерохроматина — центромеров и теломеров хромосом и око-  
лоядрышкового гетерохроматина (см. ниже). Основная часть са-  
теллитной ДНК обычно не транскрибируется *in vivo*. Сателлит-  
ной ДНК отводили определенную роль в процессах конъюгации  
хромосом в мейозе и обеспечении пространственной организации  
хромосом в интерфазном ядре: теломерные участки хромосом



прикрепляются к плотной пластинке ядра (ламине, см. рис. 105). Много ценной информации было получено в 60-е годы о белках ДНП. В биохимических исследованиях четко выявлена их структурная и функциональная гетерогенность. Все белки ДНП подразделяются на две большие группы: гистоны и негистоновые белки. Гистоны представлены пятью основными фракциями (H1, H2a, H2b, H3, H4). Гистоны обладают рядом общих свойств и построены по одному принципу. Один или оба концевых участка молекулы гистона имеют неупорядоченную конфигурацию и образованы положительно заряженными аминокислотами. Остальная часть молекулы имеет глобулярную структуру и характеризуется выраженной гидрофобностью. Гистоны способны подвергаться различным модификациям — фосфорилированию, поли-АДФ-рибозилированию, метилированию и ацетилированию. Гистоны H2a и H2b иногда образуют комплексы с убиквитином. Гистоны H1, H2a и H2b содержат большое количество лизиновых остатков (особенно H1), а в состав молекул гистонов H3 и H4 входит множество остатков аргинина. Модификации гистонов могут быть выражены в разной степени и приводят к изменениям их свойств.

Гистоны H3 и H4 отличаются удивительной эволюционной консервативностью. У филогенетически отдаленных форм (классический пример — тимус телят и проростки гороха) эти гистоны различаются местоположением лишь одного-двух аминокислотных остатков. Столь высокая филогенетическая стабильность гистонов свидетельствует как о специфичности функций этих белков в структурной организации хроматина, так и о значности ее реализации в живой природе. Гистон H1, наоборот, характеризуется значительной вариабельностью. Это проявляется не только в различиях аминокислотного состава и последовательности аминокислот у гистонов H1 разных видов животных, но и в наличии нескольких вариантов этих белков в клетках одного организма и даже в одной клетке. Кроме того, в некоторых случаях, например в ядерных эритроцитах позвоночных, гистон H1 замещается гистоном H5, белком, возникшим в эволюции, по-видимому, независимо и параллельно с гистоном H1. Гистоны H2a и H2b характеризуются сравнительно большой консервативностью, хотя и не в такой мере, как гистоны H3 и H4. Разные субфракции гистона H1 синтезируются на определенных стадиях клеточного цикла. У млекопитающих одна из субфракций H1 выявляется в интенсивно делящихся клетках и характерна для злокачественной трансформации. В 60-е годы гистонам приписывали роль регуляторов транскрипции. Однако данные об универсальности этих белков в клетках эукариот, большой консервативности отдельных фракций гистонов и, наконец, отсутствие выраженной тканевой специфичности, привели к заключению, что гистоны участвуют в



укладке ДНК в хроматине клеток эукариот. Весьма интересным с этой точки зрения явился факт, что в случае необходимости особо плотной упаковки ДНК в ядерном аппарате происходит замена гистонов другими белками. Именно такая ситуация наблюдается в зрелых сперматозоидах многих видов многоклеточных животных. Гистоны по мере созревания сперматозоидов и прогрессирующей конденсации ДНП заменяются другими белками (протаминами, цистеинпротаминами) с еще более выраженными щелочными свойствами.

Фракция негистоновых белков весьма гетерогенна. Она включает многочисленные белки-ферменты, обеспечивающие процессы репликации, транскрипции и вторичных преобразований гистонов, часть белков ядерного матрикса, НМГ-белки (см. ниже) и т. д.

Крупные успехи, достигнутые в 60-е годы в биохимических исследованиях хроматина, не могли не привлечь внимание цитологов. Кроме того, дальнейшее изучение организации ДНП, принципов его упаковки в ядерном аппарате, структурной организации и ее регуляции требовало сочетания биохимических методов с методами структурно-цитологического анализа. Серия комплексных морфобиохимических исследований была проведена на выделенном хроматине с использованием просвечивающего и сканирующего электронных микроскопов. В результате этих исследований было установлено, что ДНП обычно представлен фибриллами диаметром 12,5; 25; 50 нм, образующими сложную переплетающуюся сеть. Изучение химического состава фибрилл и свойств их компонентов в совокупности с анализом морфологических картин привело в конце 60-х годов к созданию первой научной концепции структурной организации ДНП интерфазных хромосом эукариотных клеток. По этой концепции дуплекс (двойная спираль) гигантской молекулы ДНК хромосомы спирально закручивается и удерживается в таком состоянии сплошной оболочкой из молекул гистонов всех пяти классов, взаимодействующих между собой и с нуклеотидами ДНК. В результате этого взаимодействия образуется фибрилла диаметром 12,5 нм, которая и представляет собой первый устойчивый уровень организации ДНП. Фибрилла диаметром 25 нм, или второй уровень организации ДНП, возникает путем спирального закручивания первичной фибриллы. Такое закручивание происходит в результате взаимодействия поверхностных групп гистоновых молекул соседних участков первичной фибриллы, обусловленных вторичными изменениями молекул гистонов, например, их фосфорилированием. Из фибрилл диаметром 25 нм, в свою очередь, таким же образом формируются фибриллы диаметром 50 нм.

Эта концепция (гипотеза «гистоновой шубы») получила широкое распространение в конце 60-х и начале 70-х годов. Однако к концу этого периода (1972—1973 гг.) были накоплены



Факты, не совместимые с рассмотренной схемой организации ДНП. Так, в опытах по ферментативному гидролизу ДНП было показано, что на первых этапах гидролиза ДНП разрезается на отрезки размером 200 нуклеотидных пар или кратные им. Очевидно, что эти результаты свидетельствуют о наличии в ДНП особых участков, где ДНК оказывается наиболее доступной для атаки нуклеазам. Иными словами, данные опытов по перевариванию ДНП свидетельствовали о существовании некоей периодичности, характерной для строения ДНП. Этот факт не следует непосредственно из модели организации ДНП по принципу «гистоновой шубы».

В это же время А. Олинс и Д. Олинс применили для исследования хроматина метод, предложенный ранее для наблюдения транскрипции. Их результаты принципиально отличались от полученных ранее: фибриллы хроматина обнаруживали четко выраженную субъединичную структуру. Они состояли из небольших глобул («бусинок») диаметром около 10 нм, связанных между собой нитью ДНК. Оказалось, что степень конденсации таких глобул зависит от ионной силы и ионного состава изоляционной среды. (Эти данные казались настолько необычными, что исследователи в течение года не решались их опубликовать.) После публикации глобулы стали называть нуклеосомами, а субъединичную модель организации хроматина — нуклеосомной, или моделью «бусинок на нитке».

В течение нескольких лет благодаря большому количеству прямых экспериментальных доказательств модель «бусинок на нитке» получила широкое распространение и в настоящее время является общепринятой.

Создание нуклеосомной модели организации хроматина вызвало необходимость более детального анализа гистонов, способ их взаимодействия между собой и с ДНК. Удалось показать, что одним из характерных свойств этих белков является их стремление к агрегации. Гистоны H3 и H4 *in vitro* образуют тетрамерные комплексы ( $H3_2 \cdot H4_2$ ), а H2a и H2b — смеси олигомеров. Совокупность олигомеров и тетрамерных комплексов дает диффракционную картину, характерную для нативного хроматина. Белковая глобула, составляющая основу нуклеосомы, содержит по две молекулы гистонов H2a, H2b, H3 и H4 — гистоновый октамер. Длина отрезка ДНК нуклеосомы — 145—200 н. п. Нуклеосомы, содержащие гистоновый октамер и 145 н. п. ДНК, называются коровыми нуклеосомами. В их состав не входит гистон H1. Коровые нуклеосомы соединены участками ДНК длиной 20—90 н. п. — линкерами. Размеры линкеров варьируют у разных объектов. С линкерами обычно ассоциируется гистон H1 (рис. 73). Частицы, включающие коровую нуклеосому, линкер и гистон H1 (одна молекула на нуклеосому), соответствуют так называемой полной нуклеосоме.

Первоначально предполагали, что нуклеосома имеет форму



«бублика», на который намотана ДНК. Сейчас с помощью рентгеноструктурного анализа удалось показать, что нуклеосома представляет собой плоский диск диаметром 11 нм и высотой 5,5 нм. Гистоны находятся внутри диска, а ДНК обвивает его (рис. 74), образуя 1,75 витка спирали (два полных витка — 165 н.п.). С помощью различных тонких методов получены и данные о взаимном расположении гистонов и ДНК в нуклеосомах.

Лишенный гистона H1 хроматин часто образует зигзагообразную структуру — нуклеосомы располагаются в форме зигзага (рис. 75, А). В присутствии H1 нуклеосомы тесно прилегают друг к другу, образуя фибриллу толщиной 10 нм. При этом происходит 7-кратная компактизация ДНК. Следующий уровень организации ДНП — это фибрилла толщиной 30 нм; существует несколько моделей ее структуры. Согласно «соленоидной» мо-

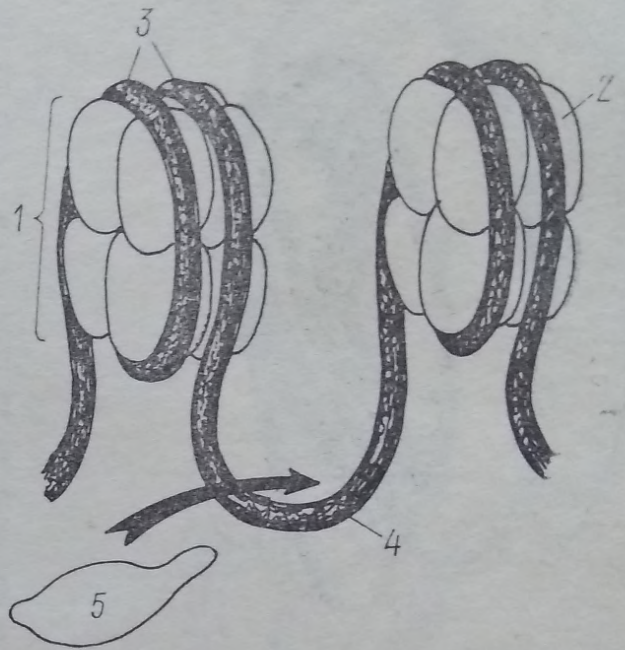


Рис. 73. Упаковка ДНК в нуклеосомы.

1 — коровая частица; 2 — октамер гистонов; 3, 4 — ДНК коровой частицы (3) и линкера (4); 5 — гистон H1.

дели формирование 30-нм фибриллы происходит в результате либо суперспирализации 10-нм фибриллы (рис. 75, Б), либо образования компактной зигзагообразной структуры, которая, в свою очередь, тоже суперспирализуется (рис. 76, В). Согласно другой модели — нуклеомерной или супербидной — 8-10 нуклеосом объединяются в «сверхбусину» — нуклеомер, или супербид (superbead), а они формируют 30-нм фибриллу (рис. 75, В), при этом происходит 40-кратная компактизация ДНК.

Расчеты количества ДНК, приходящейся на одну хромосому в клетках эукариот, т. е. составляющей одну гигантскую молекулу, показали, что укорочения этой молекулы в результате упаковки в нуклеомеры, или супербиды, недостаточно для укладки ДНК даже в интерфазной хромосоме. Следовательно, должен существовать по крайней мере еще один уровень компактизации ДНП.

Упаковка ДНП на этом уровне — петельном, или доменном (рис. 76), обеспечивается взаимодействием ДНП с белками ядерного матрикса (рис. 77).

Относительно конкретных способов упаковки ДНП с помощью белков ядерного матрикса существуют различные точки



зрения. Согласно одной из них эти белки образуют в центре хромосомы непрерывный тяж (хромосомный остов), к которому крепятся петли нуклеомеров. Исследователи, придерживающиеся другой точки зрения, считают, что белки ядерного матрикса формируют не сплошной остов по длине хромосомы, а множество дискретных центров (соответствующих ее хромомерным участкам), к которым и крепятся петли ДНП длиной 30—90 тысяч н. п., образуя «розетки». Эти организующие центры могут, в свою очередь, укладываться вместе с комплексом более или менее плотно упакованных нуклеомерных петель в структуры более высокого ранга. Такого рода укладка ДНП характерна для формирующихся метафазных хромосом. Таким образом, компактизация на этом уровне включает укладку нуклеомерных петель в области хромомерных участков и упаковку последних в хромосому. Другие данные относительно упаковки ДНП в митотических хромосомах мы рассмотрим при характеристике процессов репродукции клеток.

Для понимания общих закономерностей упаковки ДНК в хромосомах необходимо ее изучение во всех возможных вариантах, предоставляемых живой природой, — в геномах прокариот, митохондрий, хлоропластов и низших эукариот.

Бактериальная хромосома, или нуклеоид, представляет собой суперспирализованную гигантскую кольцевидную молекулу ДНК. Ее структура поддерживается гистоноподобными белками, которые удастся выявить, используя специальные методы обработки.

Большая часть ДНК бактерий организована в суперспиральные домены (30—50 на геном), часто ассоциированные с мембраной.

Большая часть ДНК бактерий организована в суперспиральные домены (30—50 на геном), часто ассоциированные с мембраной.

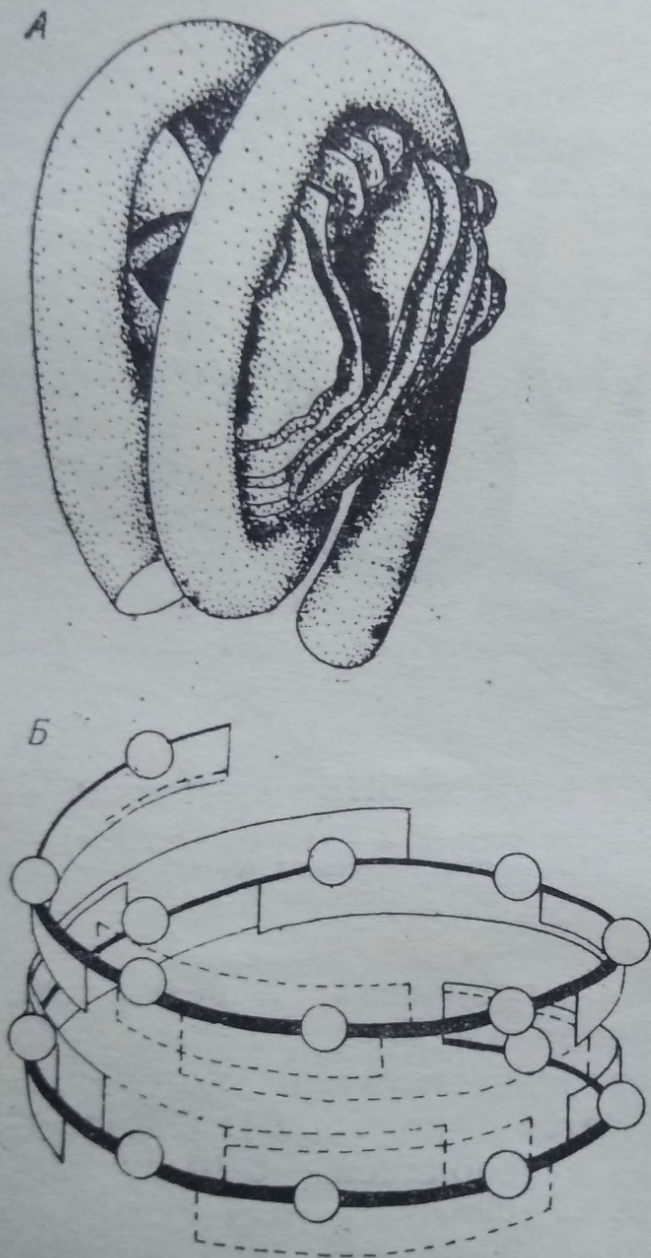


Рис. 74. Структура нуклеосомы (по: Мирзабеков, 1987).

А — пространственная модель по данным рентгено-структурного анализа, Б — карта линейного расположения гистонов на ДНК.



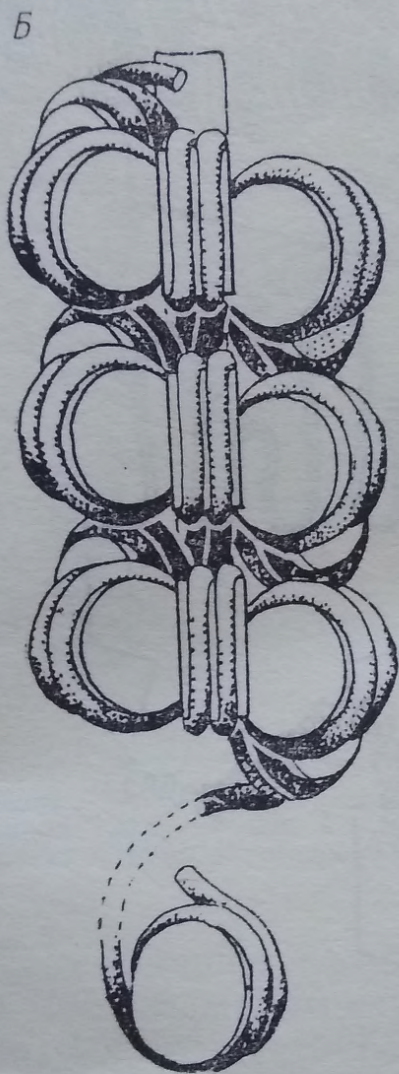
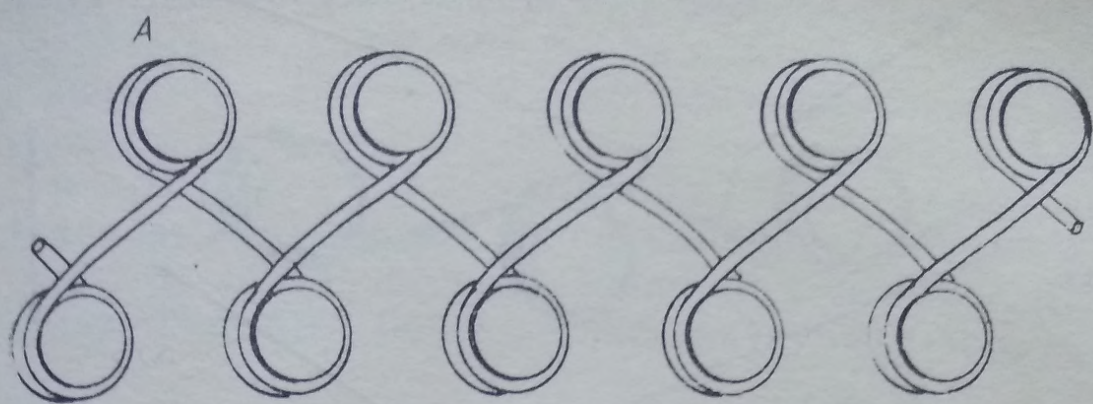


Рис. 75. Нуклеосомный уровень упаковки хроматина.

А — зигзагообразная структура, Б — соленоидная и В — супергидная модели.

Наиболее изученными гистонотодобными белками являются белки HU1 и HU2 *E. coli* молекулярной массой около 9 кД; в клетке их насчитывается до  $6 \cdot 10^4$  молекул, они формируют ленты с «карманами», где находится ДНК. Об участии этих и других гистонотодобных белков в компактной упаковке молекулы ДНК бактерий свидетельствуют иммунохимические и биохимические исследования.



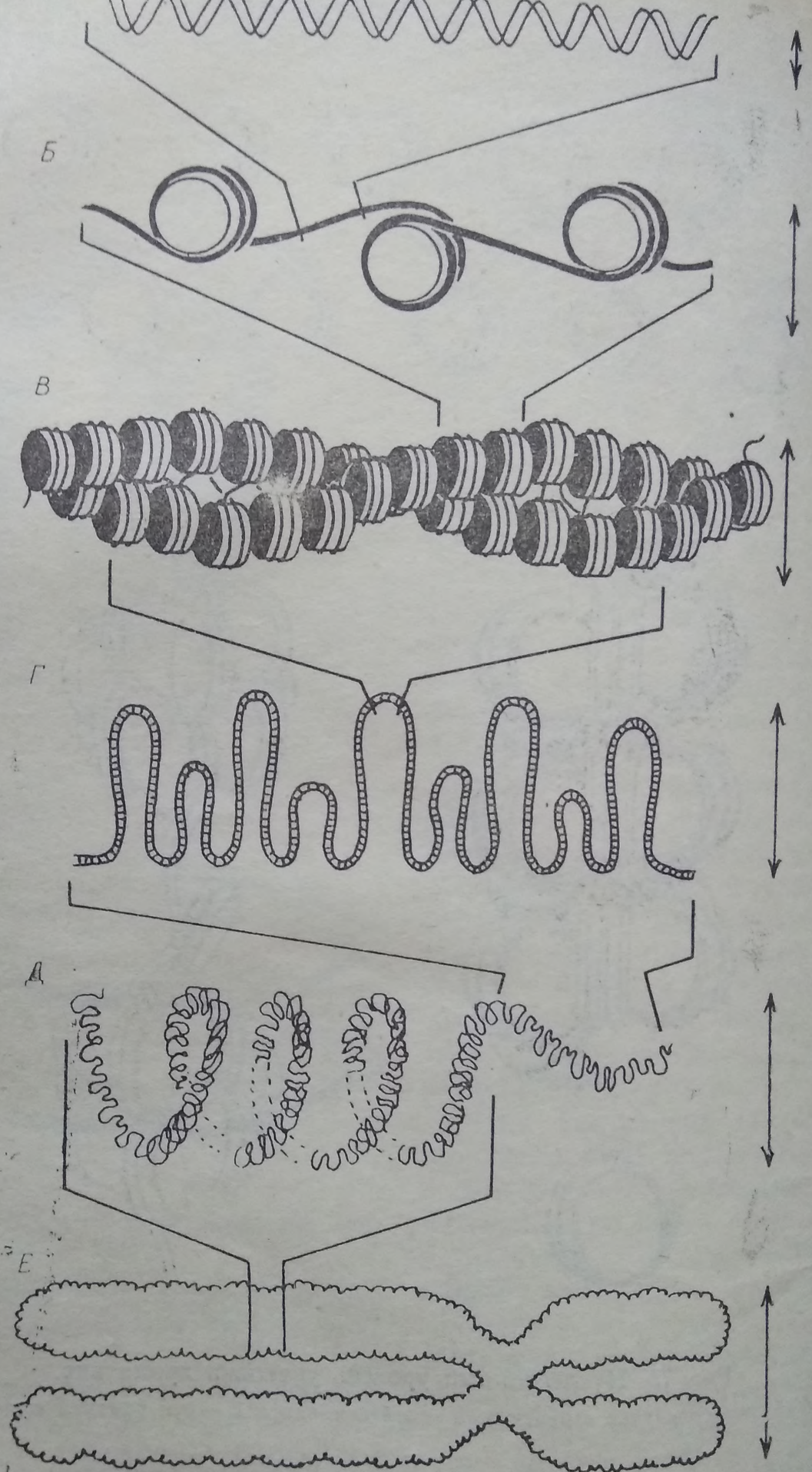


Рис. 76. Уровни компактизации хроматина (по: Спирин, 1990; Alberts e. a., 1989).

А — двойная спираль ДНК (2 нм), Б — нуклеосомная нить (11 нм), В — хроматиновая фибрилла (30 нм), Г — уровень петельных доменов (300 нм), Д — хромонема (700 нм), Е — метафазная хромосома (1400 нм).



мические данные. (Обычно эти белки не образуют структур, похожих на нуклеосомы, однако при определенных условиях у некоторых бактерий удавалось наблюдать нуклеосомоподобные частицы диаметром 100—200 нм, хромомероподобные образования, фибриллы толщиной 27—50 нм (аналог наднуклеосомного уровня) и др. Однако результаты всех этих манипуляций с ДНК бактерий не отражают, по-видимому, естественного положения дел, т. е. для проведения аналогий в упаковке ДНК эу- и прокариот требуются более веские доказательства.)

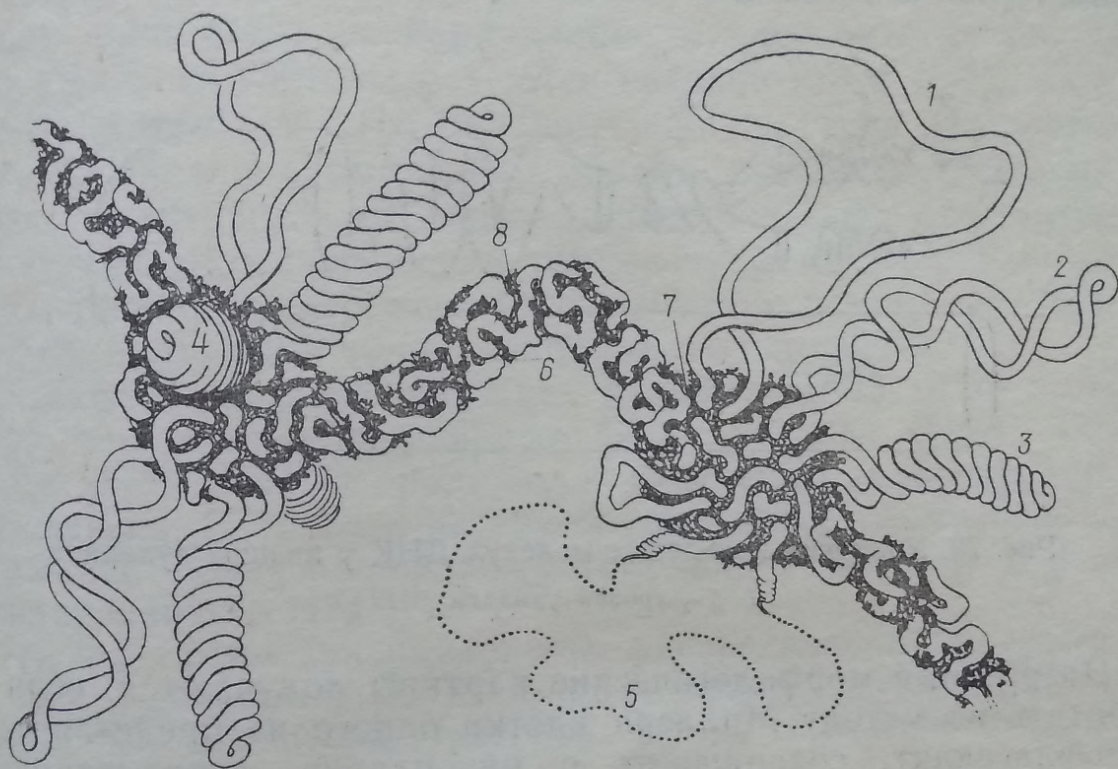


Рис. 77. Участие матрикса в упаковке ДНП.

1—4 — нуклеомерные петли разной плотности упаковки; 5 — участок нуклеомерной петли с нуклеосомной организацией; 6 — нуклеомерный тяж в межхромомерных участках ДНП; 7, 8 — белки структурного матрикса в области хромомера (7) и межхромомерного участка (8).

Интересные данные получены и относительно митохондриальных геномов. В митохондриях миксомицета *Physarum polycephalum* выявлено шесть белков молекулярной массой от 32 до 105 кДа, связанных с ДНК. В митохондриях дрожжей обнаружен лишь один ДНК-связывающий белок (20 кДа), вместе с ДНК он образует хроматиноподобные фибриллы диаметром 10—50 нм. В максикольцах митохондриального генома кинетопластид (аналог митохондриальной ДНК других клеток) белок 20 кДа, связывающийся с ДНК, на электронно-микроскопическом уровне выявляется в виде бляшек. Характер взаимодействия гистонотипных белков с ДНК митохондрий требует специального изучения.

Своеобразные отношения между ДНК и белками существуют в хроматине низших эукариот. Так, у динофлагеллят большая



часть ДНК представлена кольцевидными молекулами. Около 60% тимидина этой ДНК заменено минорным основанием — 5-гидроксиметил-урацилом. В хроматине обнаружен основной белок (16 кДа), содержащий цистеин и ароматические аминокислоты. В составе хроматина необычайно много ионов металлов (Fe, Ni, Cu, Zn), стабилизирующих хроматин путем создания ионных мостиков между ДНК и белками. ДНП упаковывается по принципу последовательной суперспирализации начиная с образования 6-нм гладкой фибриллы и кончая двойной замкнутой спиралью толщиной 250 нм (рис. 78).

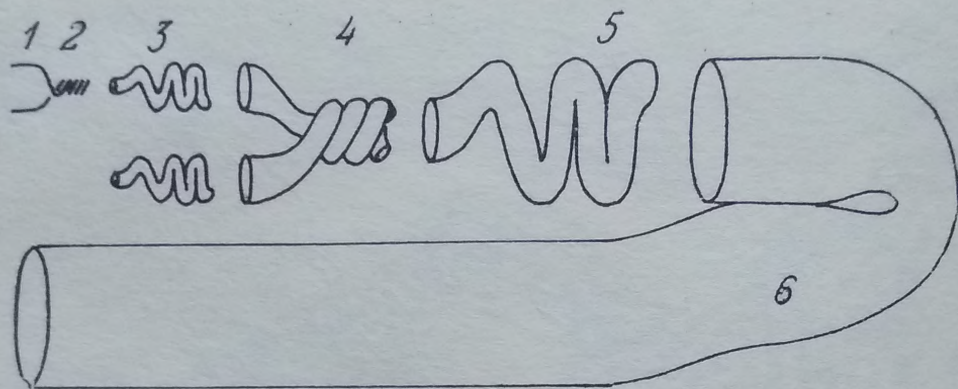


Рис. 78. Упаковка кольцевых молекул ДНК у низших эукариот.

1—6 — уровни укладки ДНК.

Интересные морфологические картины получаются, если обработать по методу Миллера клетки одного из представителей динофлагеллят, содержащих в цитоплазме эукариотический симбионт. При этом на одном и том же препарате обнаруживаются типичные нуклеосомы симбионта и фибриллы ДНП хозяина.

Особую важность для понимания организации ДНП имеет выяснение вопроса об организации активного хроматина. В настоящее время не вызывает сомнения, что функционирующие участки хроматина находятся в деконденсированном состоянии (иначе невозможен доступ к ДНК регуляторных белков, РНК-полимераз и т. д.); петли или домены «третичного» уровня организации деконденсируются, по-видимому, целиком. Как упоминалось выше, декомпактизация активного хроматина отчетливо прослеживается на политенных хромосомах и хромосомах типа ламповых щеток. С помощью электронного микроскопа можно наблюдать и собственно процесс работы гена — образование РНК; наиболее интенсивная транскрипция характерна для рибосомных генов (см. ниже) и хромосом типа ламповых щеток. Однако, несмотря на это, до сих пор однозначно не решен вопрос, сохраняются ли нуклеосомы во время функционирования хроматина. Совокупность имеющихся данных как будто указывает на то, что в участках интенсивно транскрибирующегося



хроматина нуклеосомы отсутствуют (рибосомные гены, деконденсированные петли хромосом типа ламповых щеток, активированные гены теплового шока). В регуляторных участках структурных генов нуклеосомы также не обнаруживаются. В районах умеренной транскрипции наблюдаются одиночные нуклеосомы или небольшие группы их, лишенные, однако, гистона H1 (10-нм фибриллы). По мнению ряда авторов РНК-полимераза, двигаясь по ДНК, сталкивает гистоны с нити, передавая их каким-то промежуточным акцепторам (HMG-белки, нуклеоплазмин и т. д.). Согласно другой точке зрения в процессе транскрипции происходит разворачивание нуклеосомы на две половинки, при этом гистоны остаются связанными с ДНК. При исследовании методом ДНК-белковых сшивок генов теплового шока оказалось, что промоторная область всегда свободна от нуклеосом, неактивные же гены, напротив, имеют нуклеосомную организацию: при повышении температуры индуцированные гены утрачивают нуклеосомы. Однако такие данные все-таки не являются прямыми и вопрос окончательно не решен.

Активный хроматин обогащен белками HMG (high mobility group); это низкомолекулярные белки 26 кДа (HMG 1/2) и 10 кДа (HMG 14/17); роль их в активации транскрипции до конца неясна. В области активного хроматина также повышено содержание модифицированных гистонов, в том числе и убиквитинированного H2a.

Неясны также закономерности распределения нуклеосом в процессе репликации ДНК. В этом процессе участвуют промежуточные акцепторы гистонов (такие как нуклеоплазмин ооцитов *Xenopus*).

## 4.5. СИНТЕЗ И СОЗРЕВАНИЕ РНК

Организация и регуляция синтеза РНК эукариотных клеток — один из основных вопросов современной молекулярной биологии. Работа генома может регулироваться на разных уровнях — транскрипции, процессинга, трансляции, посттрансляционных изменений, транспорта продуктов и т. д. Проблема регуляции генной активности подробно обсуждается в соответствующих руководствах по молекулярной биологии; мы остановимся лишь на некоторых аспектах этой проблемы.

**Информационные РНК.** Представления о сложной организации и регуляции процессов синтеза и РНК сложились после того как было обнаружено в геноме эукариотных клеток значительное количество ДНК, не используемой в процессах жизнедеятельности клеток: в 60-е годы в цитологических исследованиях было показано, что большая часть РНК, синтезируемой в ядре, не выходит в цитоплазму и не участвует в процессах трансляции. Тогда же было предложено несколько гипотез



относительно общих принципов организации структурных генов в клетках эукариот.

Однако на научную основу анализ процессов синтеза и созревания иРНК у эукариот удалось перевести, только используя модельные объекты, в частности клетки, зараженные вирусом. (Так, у вируса SV 40 транскрибируется всего пять генов, в то время как в клетке млекопитающих — в среднем около 50—100 тысяч генов.)

В транскрипции у эукариот участвуют РНК-полимеразы I, II, III, из них первая осуществляет синтез ядрышковой РНК, вторая — всех информационных РНК, и третья — тРНК, 5S рибосомных РНК и малых ядерных РНК (мяРНК).

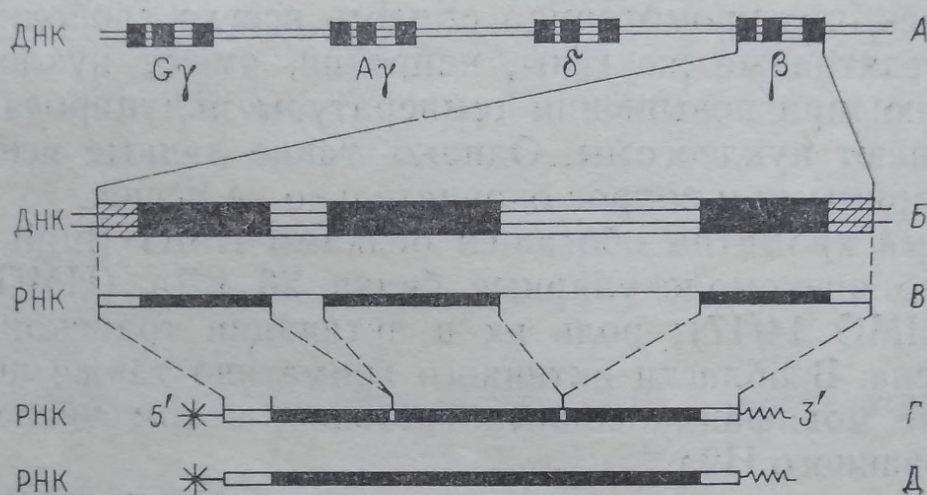


Рис. 79. Расположение глобиновых генов (А), организация гена, кодирующего иРНК для  $\beta$ -цепи глобина definitive гемоглобина (Б), первичного транскрипта глобинового гена (В) и процессинга иРНК (Г, Д).

А, Б: черные участки — экзоны, светлые — интроны; косая штриховка — нетранслируемые участки ДНК; В—Д: двойные линии — участки РНК, считанные с экзонных, одинарные — с интронных участков ДНК; черным показаны транслируемые, светлым — нетранслируемые участки на концах молекулы РНК; просветы в зачерненных участках — места сшивки фрагментов РНК, считанных с экзонов глобинового гена; звездочка — кэп-участок на 5'-конце молекулы иРНК, волнистая линия — полиА-участок на 3'-конце.

При синтезе иРНК в течение первой секунды, когда длина новообразованной РНК достигает лишь 30 нуклеотидов, на ее 5'-конце образуется специальная защитная группировка (шапочка, или кэп) — метилированный гуанозин (производное гуанина), связанный с первым нуклеотидом иРНК цепочкой из трех фосфатных групп (рис. 79). После появления кэпа продолжается синтез иРНК со скоростью 30—50 нуклеотидов в секунду.

Завершается процесс присоединением к нуклеотиду, который будет последним, специальных последовательностей приблизительно из 150—200 адениловых нуклеотидов (поли-А). Длина поли-А-участка различается у разных типов иРНК и зависит от возраста молекулы: по-видимому, при помощи аденилового «хвоста» регулируется уровень стабильности молекул иРНК.



В модельных опытах на ооцитах ксенопуса показано, что глобиновая иРНК с удаленным адениловым участком значительно менее устойчива, чем нативная глобиновая иРНК с адениловым «хвостом».

Сравнение иРНК в ядре и цитоплазме показало, что ядерные иРНК значительно длиннее (у млекопитающих иРНК в ядре в среднем содержит 5000 н.п., а в цитоплазме — 1000).

При детальном анализе этих различий оказалось, что концы ядерной и цитоплазматической иРНК одинаковы: и там, и там есть кэпы на 5'-концах и участки из адениловых нуклеотидов на 3'-концах. Следовательно, при созревании иРНК происходит вырезание фрагментов в средней части молекулы-предшественника.

Именно таким образом было обнаружено, что в ДНК существуют незначащие участки — интроны, которые транскрибируются, но не транслируются и вырезаются в процессе созревания иРНК. Их суммарные размеры часто превышают размеры транслируемых участков — экзонов. Так, величина овальбуминового гена у птиц — 7564 н.п., а соответствующей этому гену зрелой иРНК — всего 1872 н.п. Следовательно, на долю интронов (их семь) приходится 5692 н.п. Известны и гены, содержащие 25—50 интронов. Процессы, обеспечивающие точное вырезание интронов и сшивание концов соседних экзонов, получили название сплайсинга.

Классические наблюдения сплайсинга были сделаны на иРНК аденовируса методом гетеродуплексного анализа. В его основе лежит способность РНК комплементарно взаимодействовать с той цепью ДНК, с которой они были транскрибированы. Если денатурировать ДНК и добавить зрелую иРНК, то прежде, чем произойдет ренатурация ДНК, к одной из ее цепей присоединится иРНК. Гетеродуплекс ДНК-РНК можно наблюдать в электронном микроскопе; интронные участки ДНК данного гена будут образовывать петли, поскольку в зрелой иРНК не будет соответствующих им комплементарных последовательностей.

Образование «коротких» иРНК с «длинных» генов в принципе возможно тремя способами: 1) при транскрипции ДНК «выпетливает» ненужные участки и РНК-полимераза в основании петли переходит на следующий участок, минуя «петлевые» нуклеотиды; 2) считывается длинный транскрипт, а в процессе созревания РНК ненужные участки молекул вырезаются и освободившиеся концы сшиваются; 3) считываются по отдельности разные участки, а затем синтезированные молекулы РНК сшиваются. Оказалось, что наиболее универсален второй механизм. Однако существует довольно много примеров, когда используется и «выпетливание» ДНК, например при синтезе иммуноглобулинов в иммунокомпетентных клетках.

Гетеродуплексный анализ процессов транскрипции овальбу-



минового гена птиц (рис. 80) показал, что сплайсинг транскрипта этого гена (состоящего из восьми экзонов и семи интронов) протекает в два этапа. На первом этапе удаляется пять интронов, а на втором оставшиеся два.

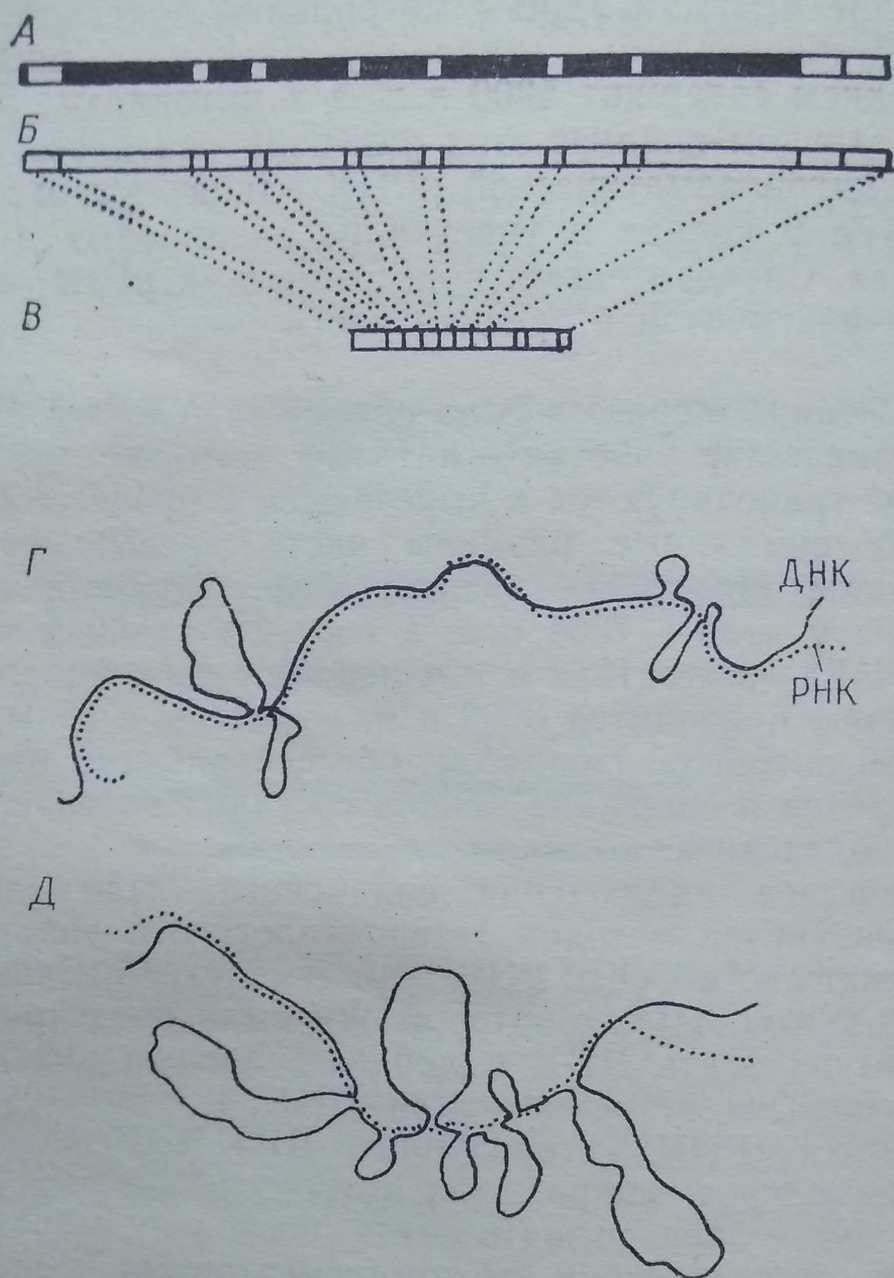


Рис. 80. Сплайсинг овальбуминового гена.

А — структура гена; Б — ДНК-подобная РНК (ДРНК); В — иРНК; Г, Д — гетеродуплекс ДНК и РНК на одном из первых (Г) и заключительном (Д) этапах сплайсинга. Светлые участки — экзоны, черные — интроны.

Меняя ход сплайсинга, можно с одного и того же гена получить разные иРНК — это так называемый альтернативный сплайсинг. Очень широко распространен альтернативный сплайсинг у вирусов, что позволяет им резко увеличивать информационную емкость небольших участков ДНК. Имеется много примеров такого типа сплайсинга у эукариот; одним из первых и классических служит образование мембранной и секреторной форм иммуноглобулина класса М. Информационные РНК для этих двух белков считаются с одного гена. Однако один из экзонов, кодирующих гидрофобную часть белковой цепи мем-



бранной формы, при созревании иРНК секреторной формы вырезается как интрон.

Еще один пример альтернативного сплайсинга — это образование адгезивной формы фибронектина. Как отмечалось выше, у млекопитающих фибронектин существует в двух формах — адгезивный фибронектин клеточной поверхности, синтезируемый самими клетками, и фибронектин плазмы крови, который вырабатывается клетками печени. Обе формы кодируются одним и тем же геном, но «печеночный» фибронектин короче адгезивного, в его составе нет одного аминокислотного домена, информация о котором удаляется в виде интрона при созревании «печеночной» фибронектиновой иРНК.

Из приведенных примеров ясен биологический смысл альтернативного сплайсинга у эукариот. Этот относительно простой механизм позволяет резко увеличить регулируемую информационную емкость генома, а следовательно, эволюционную и функциональную пластичность клеток.

Все, что известно о механизмах сплайсинга, подробно излагается в специальных руководствах по молекулярной биологии; здесь мы ограничимся самыми краткими сведениями об этих процессах.

Сплайсинг должен осуществляться очень точно, так как сдвиг на один нуклеотид повлечет за собой изменение трансляции и образование «неправильных» белков. Как правило, интроны начинаются с нуклеотида GT и кончаются AG.

К настоящему времени идентифицированы некоторые компоненты, необходимые для протекания сплайсинга. Это особые РНП-частицы с константой седиментации 10 S, относящиеся к классу малых ядерных РНП, они есть во всех эукариотных клетках. В каждой такой частице содержится одна молекула РНК и около семи молекул белков. РНК длиной 90—400 нуклеотидов обогащены урацилом и обозначаются UРНК (U1, U2 и т. д.). Малые ядерные РНК весьма эволюционно консервативны. Нуклеотидные последовательности мяРНК комплементарны последовательностям ДНК на границах экзон—интрон; мяРНП объединяются в более крупные частицы с константой седиментации около 60 S, получившие название сплайсосом. Кроме мяРНП в состав сплайсосом входит ряд белков. Структура сплайсосом (так же как роль мяРНК в процессах сплайсинга) остается все еще не выясненной.

Помимо сплайсинга, который осуществляется с участием сплайсосом, существует и так называемый самосплайсинг, или автокаталитический сплайсинг, — в этом случае молекула РНК сама обеспечивает точное вырезание интрона благодаря образованию определенной вторичной и третичной структуры. Для этого необходимо наличие в интронах конкретных нуклеотидных последовательностей, достаточно эволюционно консервативных. Самосплайсирующиеся интроны обнаружены в рРНК



макронуклеуса инфузорий, митохондрий дрожжей и хлоропластов ряда растений, а также у прокариот (ген тимидилатсинтазы фага T4). Обнаружение самосплайсинга американским ученым Т. Чеком и соавторами — одна из последних сенсаций в биологии, ибо таким образом была открыта каталитическая роль РНК (до сих пор, как известно, считалось, что способностью к биокатализу обладают только белки). Кроме самосплайсинга описаны уже и другие примеры каталитической функции РНК. Это открытие вызвало появление новых эволюционных теорий, в основу которых легло допущение, что первичная форма живой материи — это самовоспроизводящаяся молекула РНК.

In vitro в реакциях самосплайсинга участвуют и белки, но играют здесь только структурную роль, способствуя поддержанию необходимой для сплайсинга конфигурации интронного участка молекулы РНК. Так, при синтезе одной из субъединиц цитохрома b митохондрий нейроспоры в процессе сплайсинга принимает участие белок матураза, частично кодируемый интроном, расположенным в гене этой субъединицы. При воспроизведении этого процесса in vitro без матуразы сплайсинг, вернее самосплайсинг, происходит с меньшей скоростью. Аналогичные данные получены и в экспериментах со способной к самосплайсингу рРНК тетрахимены. Если добавить к этой РНК ассоциирующиеся с ней белки, скорость самосплайсинга возрастает.

Еще один интересный вариант преобразований РНК обнаружен у ряда видов трипаносом и нематод — так называемый трансплайсинг. Суть его заключается в том, что в процессе сплайсинга происходит объединение экзонов не одной, а двух молекул РНК-предшественников, транскрибированных с разных генов, которые могут быть локализованы в разных хромосомах. Трансплайсинг показан для транспортных РНК и для тубулиновых иРНК. Интересно, что и у разных видов трипаносом и особенно между ними и нематодами наблюдается сходство вторичной структуры РНК при отсутствии большой гомологии в последовательности нуклеотидов.

Интересно отметить, что наряду с таким своеобразным трансплайсингом у этих объектов наблюдается и «классический» сплайсинг с использованием мРНК.

Рассмотренные выше модификации посттранскрипционных изменений РНК, обнаруженные в широких сравнительных исследованиях, представляют большой интерес для решения проблем эволюции. Существуют две точки зрения на происхождение интронов: 1) «древние» гены изначально включали интронные участки, а безинтронные гены прокариот и некоторые гены эукариот — результат потери интронов при эволюционных преобразованиях генома; 2) первичной была безинтронная организация генов, а появление интронов — особенность эволюционных преобразований генома эукариот.



Сторонники второй точки зрения в качестве источника интронов рассматривают, например, транспозоны (подвижные элементы генома, способные внедряться в ДНК хромосом про- и эукариот). Однако те транспозоны, которые известны в настоящее время, не имеют на концах последовательностей, соответствующих сайтам сплайсинга.

Интроны в родственных генах могут находиться в разных положениях (позициях), но отражает ли это возможность встраивания их в разных положениях в геном в течение эволюции — неясно, хотя в опытах *in vitro* была продемонстрирована принципиальная возможность встраивания интронов как в свою, так и в чужую РНК.

Более привлекательной, на наш взгляд, представляется идея об изначальном существовании интронов; тогда наиболее древним является именно самосплайсинг, при котором используются каталитические свойства РНК, обеспечивающие и вырезание и встраивание участков РНК в самых примитивных генетических системах. Таким образом, интроны ядерных генов могли произойти от самосплайсирующихся интронов.

В эволюции сплайсинг мог играть определенную роль в объединении небольших кодирующих участков в большие и сложные гены с новыми функциями; на основе молекулы РНК с новым встроенным участком с помощью обратной транскриптазы могла строиться ДНК-копия, которая затем включалась в геном.

Кроме того, существует ряд фактов, свидетельствующих в пользу предположения о первичности интронной структуры гена. Так, у филогенетически отдаленных видов глобиновые гены имеют сходную структуру (два интрона и три экзона). В ряде белков, имеющих доменную структуру, одинаковые домены кодируются сходными экзонами — например, экзон, кодирующий один из доменов белка-активатора плазминогена, характерен для гена фибронектина; другой экзон гена-активатора плазминогена обнаружен в генах эпидермального фактора роста. Есть и другие примеры существования одинаковых экзонов в разных генах. В эволюции, таким образом, происходила перекомбинация экзонов. Анализ гомологии нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих сходные белки, позволяет заключить, что наибольшая вариабельность в эволюции свойственна интронам, а не экзонам. По мнению многих исследователей, изменения структуры интронов могли произойти в результате перекомбинации (вставок и выщепления) экзонов, происходящей по районам интронов.

Заманчиво было бы предположить, что указанные выше моделификации сплайсинга отражают в известной мере этапы превращения самосплайсинга через трансплайсинг в типичный классический сплайсинг, доминирующий в эукариотных геномах. Однако, обсуждая подобные вопросы и пытаясь установить связь между разными типами сплайсинга, надо учитывать, что



в настоящее время мы исследуем уже не первозданные, древние механизмы, а их модификации у современных организмов, работавшие в результате длительных эволюционных преобразований и, естественно, их произвольное расположение в определенной логический ряд является лишь более или менее оправданной спекуляцией.

Еще один интересный тип посттранскрипционных изменений РНК совсем недавно обнаружен в сравнительных исследованиях — это так называемое «редактирование» РНК (RNA editing). В транскрипте гена, кодирующего субъединицу II цитохром-оксидазы (COII) митохондрий *Trypanosoma brucei* (одного из представителей кинетопластид), были обнаружены четыре урациловых остатка, для которых не было комплементарных оснований в соответствующем участке гена, расположенного в максикольце митохондриальной ДНК. Затем выяснилось, что иРНК для субъединицы III цитохромоксидазы (COIII) в еще большей степени отличается от соответствующего гена — иРНК для COIII вдвое длиннее самого гена и образуется путем добавления около четырехсот (!) урациловых остатков и нескольких делеций по всей длине молекулы иРНК. Встраивание и делеция урациловых остатков происходят посттранскрипционно — в процессе «редактирования» РНК. Гены, частично соответствующие этим отредактированным копиям, были названы криптогенами. Были изолированы и нередктированные копии РНК (их последовательности полностью комплементарны геномным) и промежуточные варианты. Возникал естественный вопрос, каков же механизм редактирования, кто «редактор» и откуда он получает правильную информацию. Эту проблему исследовали на представителях разных видов кинетопластид, митохондриальные максикольца которых несут криптогены для COII и COIII. С помощью компьютерного анализа в 30-килобазном максикольце лейшмании удалось обнаружить короткие последовательности, комплементарные отредактированным участкам соответствующих транскриптов. РНК, синтезированные на этих матрицах, называли РНК-гидами, или gRNA (guide). Впоследствии обнаружили, что информация для синтеза gRNA может содержаться и в миникольцах ДНК (функция этих структур была раньше неизвестна). Предполагают, что процесс редактирования осуществляется специальными РНП-частицами — эдитосомами (по аналогии со сплайсосомами), содержащими gRNA и ряд необходимых ферментов — эндонуклеазу, урацилтрансферазу и лигазу. Процесс начинается с 3'-конца. РНК-гид спаривается с нередктированным участком, в месте первого же неспарившегося основания нуклеазы разрезают РНК-предшественник, трансфераза вставляет урацил (против А или G в gRNA). Если же не спаривается U, то происходит делеция. Затем отрезки РНК сшиваются лигазой и эдитосома двигается дальше, начиная следующий цикл.



По-видимому, редактирование РНК — механизм достаточно древний, ибо он обнаруживается у трех видов трипаносомид, разошедшихся более, чем 200—300 млн. лет назад — *Crithidia fasciculata*, *T. brucei* и *Leishmania tarentolae*.

Интересно, что криптоген СОII есть у всех этих трех видов, а ген СОIII в форме криптогена есть у *T. brucei*, но не у *L. tarentolae*, разошедшихся 100—150 млн. лет назад. По представлениям некоторых авторов, механизм редактирования мог возникнуть в результате эволюции первичного процесса, обеспечивающего образование как можно большего числа различных вариантов с матрицы ограниченного размера. Самосплайсинг и транссплайсинг могут быть реликтами других процессов, преследующих эту же цель.

Вернемся теперь к ранним этапам процессинга иРНК. Прежде чем произойдет сплайсинг высокомолекулярный предшественник иРНК — гетерогенная ядерная РНК (гяРНК) связывается с белками, образуя гяРНП. Организация гяРНП напоминает нуклеосомную организацию хроматина («бусинки на нитке»). РНК наматывается на белковые глобулы, названные информоферами; величина отрезка РНК, приходящегося на каждый информофер, составляет около 600 нуклеотидов. Информофер с навитой на него РНК образует частицу (мономер) с константой седиментации 30 S. Несколько таких мономеров в комплексе и формируют гяРНП. Ранее считали, что информоферы состоят из одного типа белка — информатина. Затем в ряде лабораторий были получены данные о выделении из информоферов многочисленных разных белков (тогда же стали использовать для их обозначения термин «коровые белки»). Клонирование ДНК для этих белков показало, что у млекопитающих они кодируются семейством эволюционно консервативных генов. Затем было обнаружено, что данные о гетерогенности белков информоферов объяснялись загрязнением этих фракций при выделении белками ядерного матрикса. В настоящее время доминирует точка зрения, что информоферы образованы семейством родственных полипептидов; за ними закрепилось название информатин. В состав каждого информофера входит около 40 молекул белков. Небольшие различия между ними зависят от вида животных, типа ткани, стадии развития и т. д. У низших эукариот обнаружен только один тип информатина.

Информатины имеют доменную организацию и содержат участки связывания РНК. При определенных условиях *in vitro* информоферы легко ассоциируют со своей или чужой гяРНК (рис. 81). Итак, высокомолекулярный предшественник иРНК — гяРНК — связывается с информоферами (рис. 82) и в таком виде подвергается процессингу, который завершается образованием зрелой иРНК. В составе гяРНП зрелая иРНК транспортируется к ядерной оболочке и здесь информоферы, по-видимому, покидают иРНК, ибо в цитоплазме она обнаружива-



ется уже в комплексе с другими белками, формируя частицы — информосомы (см. рис. 106). С особыми белками связаны также кэп на 5'-конце и поли-А-участок на 3'-конце молекулы гРНК. Вопрос о том, переходят ли эти белки вместе со зрелой иРНК из ядра в цитоплазму или их заменяют другие, окончательно не решен. Большинство исследователей склоняются к тому, что во всяком случае один из них — белок кэпа (74 кДа), сопровождает иРНК в цитоплазму.

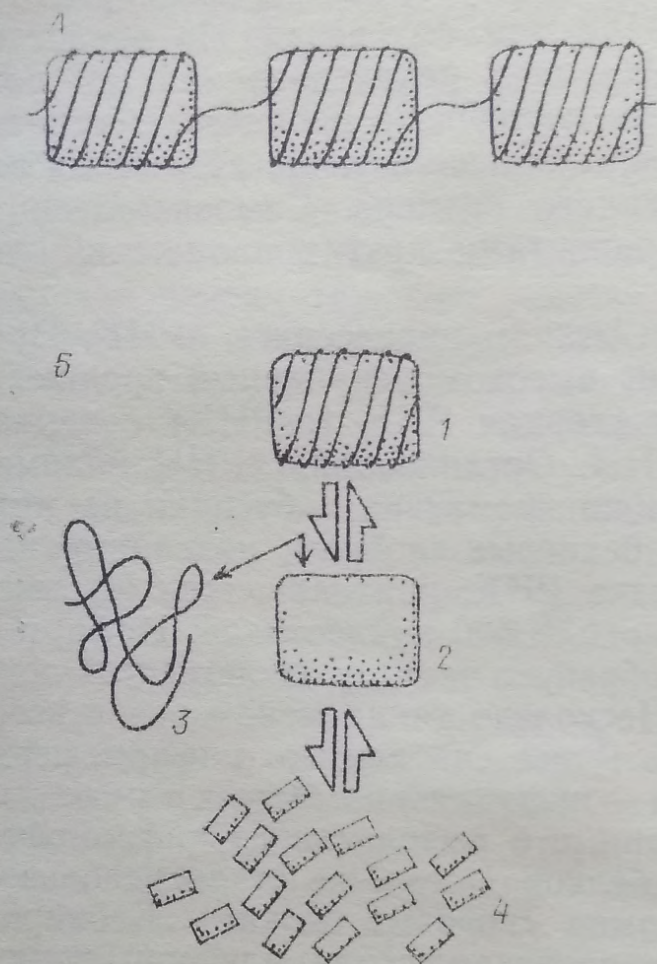


Рис. 81. Организация РНП-частиц (по: Георгиев, 1989).

А — нативные РНП-частицы, Б — обратимая диссоциация РНП. 1 — 30 S-частица; 2 — информосома; 3 — РНК; 4 — информатин.

Диаметр перихроматиновых фибрилл 2—3 нм; они чувствительны к РНКазе и при стимуляции транскрипции их количество заметно увеличивается. Перихроматиновые гранулы представляют собой скрученные перихроматиновые фибриллы. Интерхроматиновые гранулы имеют диаметр 20—25 нм, их функциональное значение неясно.

Относительно давно описанные перихроматиновые фибриллы теперь связывают со сплайсингом, а перихроматиновые гранулы, вероятно, в какой-то мере соответствуют ядерным информосомам и транспортным формам иРНК.

Однако пока нет еще точного соответствия между морфологическими и биохимическими данными о РНК-белковых взаимодействиях в процессе созревания и транспорта иРНК. Значи-

Обсуждая процессы транскрипции в ядерных геномах эукариот, в основном оперируют биохимическими данными; естественный интерес представляет вопрос об их структурном эквиваленте. Морфологические данные о синтезе иРНК весьма скудны. Электронно-микроскопические исследования показали, что в области активного хроматина наблюдаются следующие структуры: перихроматиновые фибриллы, перихроматиновые гранулы и интерхроматиновые гранулы. Все эти структуры представлены различными формами РНП.



тельно более информативным оказывается сопоставление таких данных при синтезе рРНК (см. ниже).

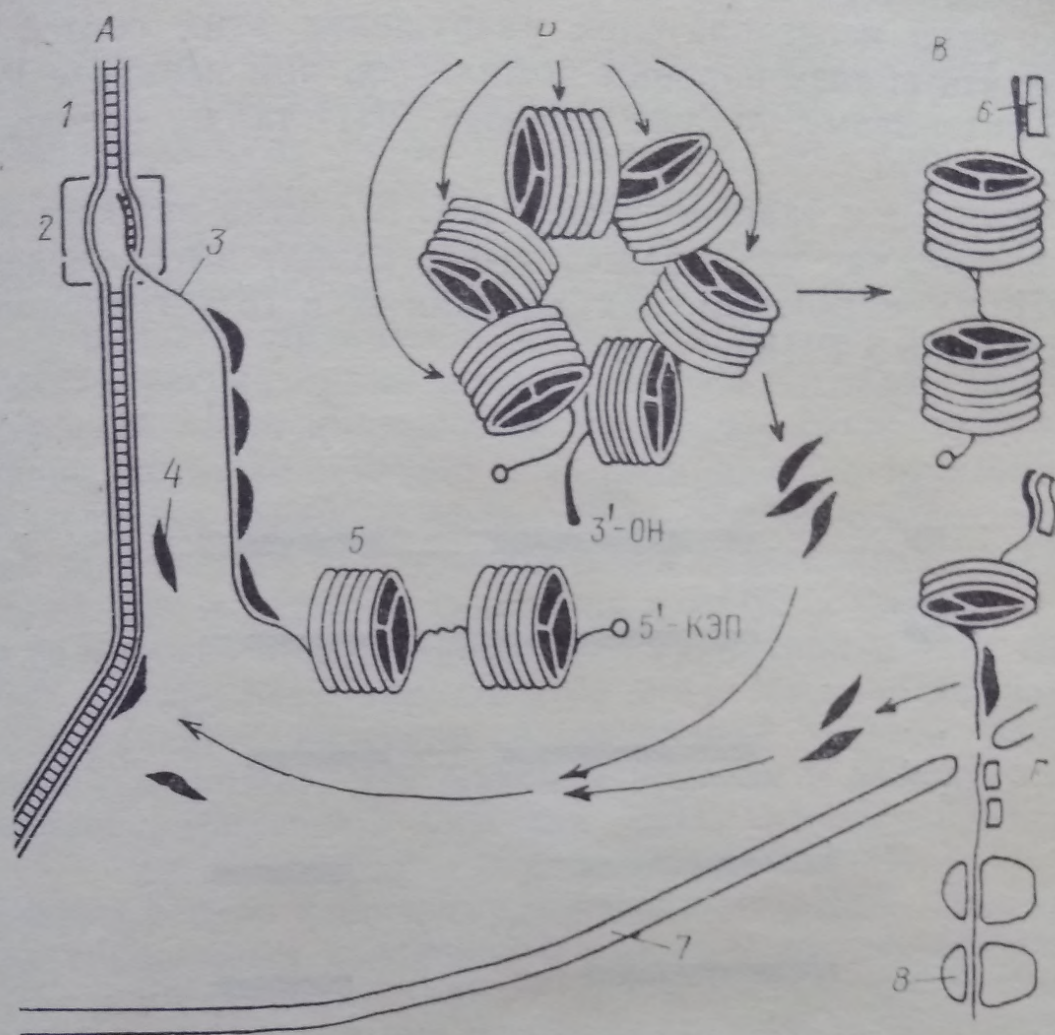


Рис. 82. Один из гипотетических вариантов информоферного цикла (по: Георгиев, 1989).

А — синтез ггРНК; Б — процессинг ггРНК; В — транспорт иРНК; Г — трансляция иРНК.  
1 — ДНК; 2 — РНК-полимераза; 3 — гетерогенная ядерная РНК; 4 — информатин; 5 — 30 S-частица; 6 — белки, связывающиеся с полиА; 7 — ядерная оболочка; 8 — рибосомы.

В организации процессов транскрипции определенную роль, по-видимому, играет ядерный матрикс. Так, ДНК, которая остается связанной с ядерным скелетом после обработки нуклеазами, содержит транскрибирующиеся последовательности, специфичные для данной клетки (глобиновые гены в клетках эритроидного ряда, овальбуминовые — в яйцеклетках и т. д.). Оказалось, что к ядерному матриксу прикреплены участки транскрипционных единиц (см. рис. 105), расположенные перед 5'-и за 3'-концами. Предполагают, что такая связь может осуществляться в области энхансеров.

В ассоциации с белками интерхроматинового матрикса является пре-иРНК; один из таких белков (40 кДа) обнаруживается в интерхроматиновых гранулах и перихроматиновых фибриллах у дифференцирующихся (но не у зрелых) клеток; предполагают, что он может участвовать в транскрипции, процессинге и транспорте РНП в цитоплазму. К скелетным ядерным



структурам прикрепляется и кэп гяРНК; видимо, с матриксом связана и РНК-полимераза. Зрелая иРНК обнаруживается как в ассоциации с белками матрикса, так и свободной от них; по мнению ряда исследователей разрушение этих связей может происходить вблизи поровых комплексов при переходе РНП из ядра в цитоплазму. Малые ядерные РНП также прочно связаны с матриксом.

**Рибосомные и транспортные РНК.** В состав рибосом эукариотных клеток, как указывалось выше, входят высокомолекулярные РНК с константами седиментации 28 и 18 S и низкомолекулярные 5,8 и 5 S РНК.

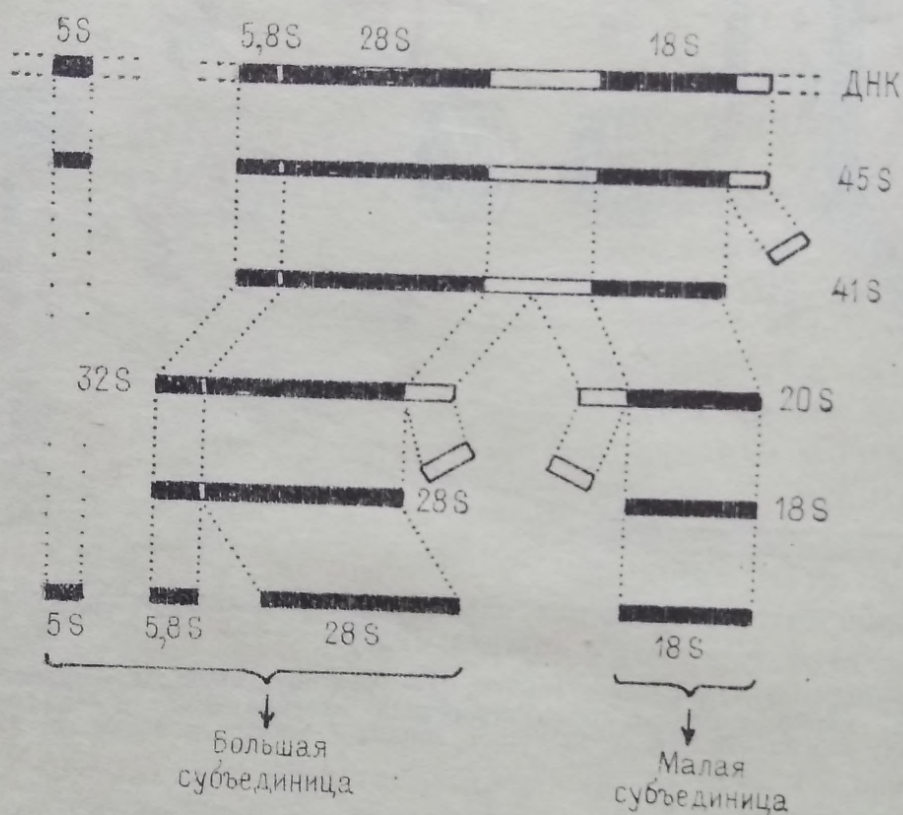


Рис. 83. Процессы синтеза и созревания рРНК эукариот.  
Объяснения в тексте.

Все типы рРНК, за исключением 5S, синтезируются на генах рРНК, сосредоточенных в участке ДНП, называемом ядрышковым организатором. ДНК ядрышкового организатора относится к умеренно повторяющимся последовательностям, т. е. гены, кодирующие рРНК, представлены несколькими сотнями копий. Повторяющиеся участки ДНК содержат линейно расположенные гены 18S, 5,8S и 28S РНК, разделенные короткими спейсерными последовательностями (рис. 83). Такие полицистронные участки ДНК также отделены друг от друга спейсерами. При этом, если гены рРНК весьма консервативны, то величина и структура разделяющих цистроны спейсеров характеризуется четко выраженной видовой специфичностью. Например, даже



у близких видов хвостатых амфибий количество гомологичных нуклеотидных последовательностей этих спейсеров не превышает 10%.

Транскрипция генов, расположенных в ядрышковом организаторе, осуществляется у эукариотных клеток РНК-полимеразой I. Одна молекула фермента считывает сразу весь участок ДНК, содержащий три гена рРНК и два разделяющих их спейсера. Раньше эти спейсеры называли транскрибируемыми в отличие от разграничивающих цистроны спейсеров, которые считались нетранскрибируемыми. Сейчас ясно, что в последних расположены регуляторные повторяющиеся последовательности, активирующие транскрипцию. В них содержится также сайт терминирования, который отвечает и за реинициацию транскрипции. Это обеспечивает высокую эффективность процесса считывания, ибо РНК-полимераза при освобождении транскрипта с матрицы не сходит с нее, а остается связанной с ДНК, и новый акт инициации не требует поиска промотора. Транскрипты этих спейсеров очень быстро деградируют и не могут быть выявлены при электронно-микроскопическом исследовании работы рибосомных генов (см. ниже). Эти факты и привели к выводу о наличии нетранскрибируемых участков ДНК, разделяющих цистроны.

Вернемся теперь к процессу образования рРНК. При транскрипции рибосомных цистронов образуется гигантская молекула РНК-предшественник (пре-рРНК) с константой седиментации 45 S. В дальнейшем она проходит созревание (процессинг), суть которого заключается в специфическом разрезании пре-рРНК на участки, соответствующие молекулам РНК рибосом (5,8; 18 и 28 S РНК), и участки, синтезированные на расположенных между генами спейсерах. Последние не выходят в цитоплазму и деградируют в ядре. Процессинг молекулы-предшественника рРНК совершается в несколько этапов (рис. 83), по видимому, при участии низкомолекулярных мяРНК U3.

Необходимо отметить, что, так же как и в случае иРНК, молекулы рРНК подвергаются процессу созревания, находясь в комплексе с белком: транскрибированные РНК соединяются с белками, образуя РНП уже в процессе синтеза гигантской молекулы-предшественника. Природа таких белков не до конца выяснена: либо это компоненты зрелых рибосом, либо белки, которые локализуются в незрелых субъединицах, а затем заменяются другими (см. ниже).

Транскрипцию рибосомных цистронов можно проследить с помощью электронного микроскопа на выделенных функционирующих генах РНК. Это впервые удалось О. Миллеру, работавшему на ооцитах амфибий и получившему таким способом картины, названные «портретами генов» (рис. 84, А). На них выявляются нити ДНК с расположенными в виде «елочек» фибриллярными структурами; участки, содержащие «елочки», раз-



делены промежутками, свободными от фибрилл. Районы ДНК с «елочками» есть не что иное, как участки линейно расположенных генов рРНК (18, 5,8 и 28 S), а промежутки между ними — спейсеры, разделяющие рибосомные цистроны (в этих участках транскрипты не обнаруживаются). Фибриллярные структуры представляют собой синтезирующиеся здесь гигантские молекулы 45 S РНК — пре-рРНК, еще не сошедшие с матрицы, а гранулы, расположенные у основания каждой фибриллы, — молекулы РНК-полимеразы. Длина фибрилл пропорциональна длине участка ДНК, пройденного ферментом от точки начала транскрипции. По количеству молекул РНК-полимераз, находящихся в каждый данный момент на транскрибируемом участке ДНК, можно судить об интенсивности транскрипции.

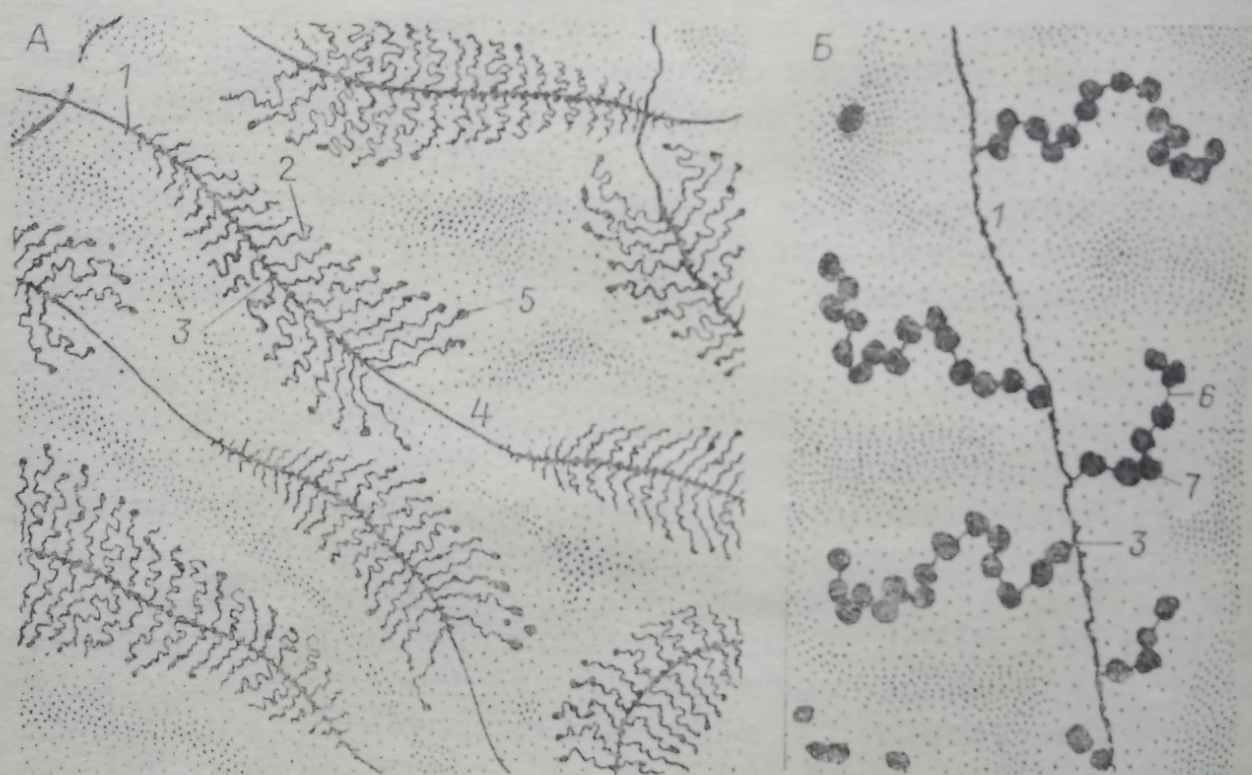


Рис. 84. Визуализация транскрипции.

А — рибосомальные гены эукариот, Б — структурные гены прокариот. 1 — ДНК; 2 — рРНК; 3 — РНК-полимераза; 4 — спейсерный участок; 5 — гранулы РНП; 6 — иРНК; 7 — рибосомы.

Необходимо отметить, что аналогичные электронно-микроскопические картины («портреты генов») удалось получить и для структурных генов с образующимися на них гигантскими молекулами гетерогенной ядерной РНК. Особенностью морфологических картин при синтезе гяРНК является лишь отсутствие правильных «елочек» транскрипции, что связано, по-видимому, с меньшей интенсивностью процесса. Кроме того, вероятно, имеются и определенные различия в интенсивности и характере первых этапов процессинга синтезированных РНК. «Портреты» работающих структурных генов у прокариот в принципе сходны с таковыми у эукариот. Особенностью этих



картин является наличие на образующейся молекуле иРНК рибосом, которые обеспечивают процессы трансляции (рис. 84, Б).

Организация генов, кодирующих 5 S рРНК большой субъединицы рибосом эукариот имеет некоторые особенности. У высших эукариот эти гены представлены сотнями или тысячами tandemно повторяющихся единиц, образующих одну или несколько групп — кластеров, разделенных спейсерами, и не входят в состав ядрышкового организатора. У низших эукариот, в частности у дрожжей, они располагаются вместе с другими генами рРНК, однако транскрипция их происходит независимо от полицистронной транскрипции других генов рРНК и осуществляется с помощью РНК-полимеразы III. Особенностью организации генов 5 S РНК является наличие внутри самого гена последовательности, которая обеспечивает инициацию транскрипции — ее узнают факторы транскрипции и РНК-полимераза. (Надо отметить, что фактор транскрипции генов 5 S РНК TFIIIA является практически единственным хорошо изученным регуляторным белком эукариот.)

Структурные основы процессов образования рибосомных РНК (в отличие от РНК других типов) изучены достаточно подробно. Имеющиеся биохимические и морфологические данные хорошо соответствуют друг другу.

Процессы синтеза и созревания рРНК происходят в ядрышке — особой субсистеме ядерного аппарата (рис. 85, 86).

Гены рРНК расположены в ядрышковом организаторе — участке хромосомы, локализованном в области вторичной перетяжки. Число ядрышкообразующих хромосом специфично для вида (от одной, как в большинстве случаев, до нескольких).

ДНП ядрышкового организатора может иметь очень разную степень конденсации. Постоянно конденсированная его часть представляет собой так называемый околядрышковый конститутивный гетерохроматин, содержащий ДНК с высоко повторяющимися последовательностями. Деконденсированный, деспирализованный участок ядрышкового организатора хромосомы, содержащий рибосомные гены, оказывается основой, на которой формируется структура, состоящая из транскриптов этих генов, белков-ферментов и белков матрикса. Хроматин ядрышка имеет хромомерное строение; ядрышковый организатор работает подобно любому другому хромомеру хромосомы — конденсируется и деконденсируется, образуя петлю, в зависимости от функционального состояния клетки. Отличие состоит лишь в том, что транскрибируемые участки других хромомеров хромосом имеют меньшую длину и более простую структуру; кроме того, продукт активности рибосомных генов ядрышкового организатора временно сохраняется на матрице, а в остальных участках хромосомы транскрипт сразу же сходит с нее.

При электронно-микроскопическом исследовании ядрышка на



срезах выявляются так называемые фибриллярные центры ядрышка и его фибриллярный и гранулярный компонент. В фибриллярных центрах обнаруживается ДНК. По мнению большин-

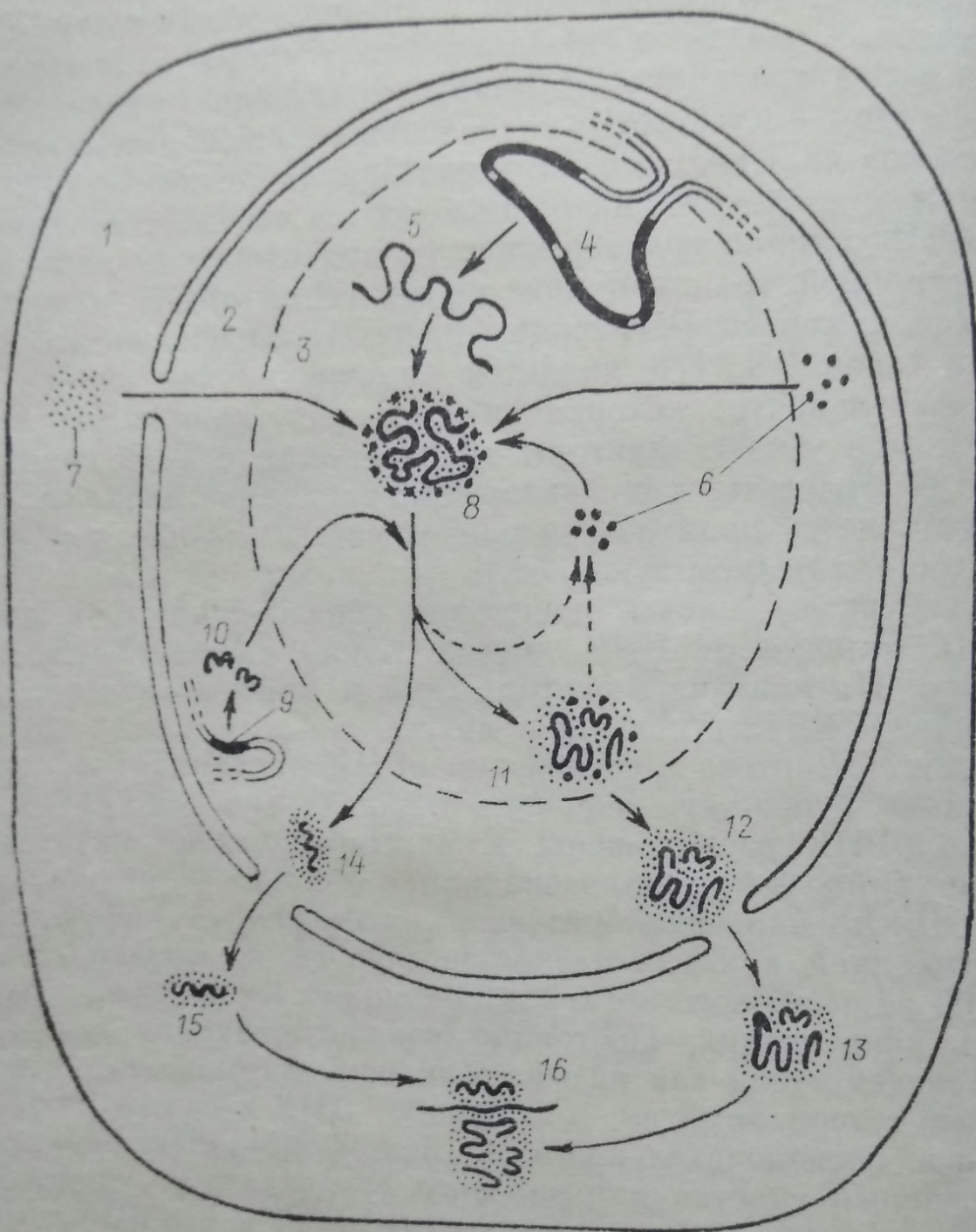


Рис. 85. Схема образования рибосом (по: Alberts e. a., 1989).

1 — цитоплазма; 2 — ядро; 3 — ядрышко; 4 — гены ядрышкового организатора; 5 — 45S РНК; 6 — белки процессинга; 7 — белки рибосом; 8 — процессинг 45 S РНК в фибриллярном компоненте ядрышка; 9 — ген 5 S РНК; 10 — 5 S РНК; 11 — незрелая L-субчастица рибосомы в гранулярном компоненте; 12, 13 — L-субчастица в ядре (12) и цитоплазме (13); 14, 15 — S-субчастица в ядре (14) и цитоплазме (15); 16 — работающая рибосома.

ства исследователей, эта ДНК представляет собой собранные вместе спейсеры, разделяющие рибосомные цистроны. Согласно другой точке зрения, в этом районе локализуются неактивные гены рРНК.

Авторадиографический анализ синтеза РНК в ядрышке показал, что включение  $^3\text{H}$ -уридина сразу после введения пред-



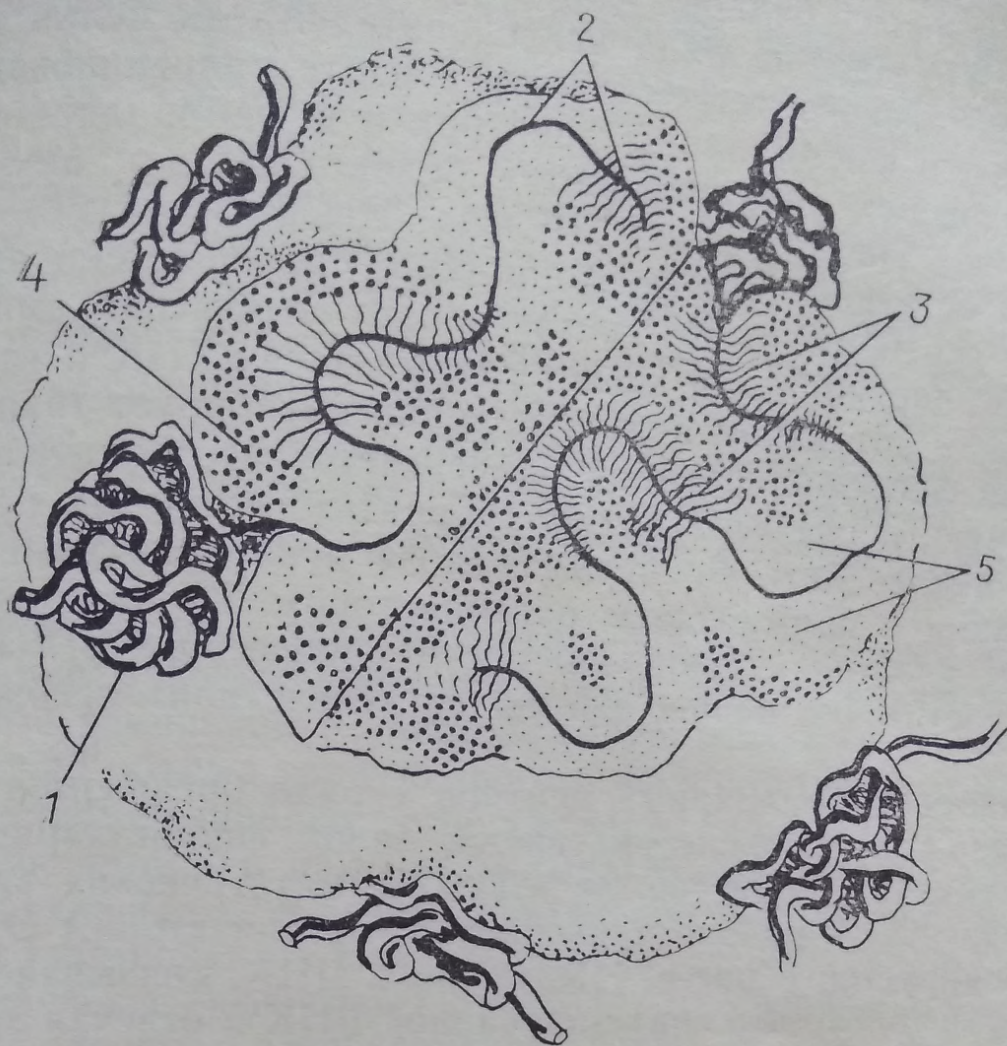


Рис. 86. Организация ядрышка.

1 — околоядрышковый гетерохроматин, 2 — ДНК ядрышкового организатора, 3, 4 — фибриллярный и гранулярный компоненты, 5 — ядрышковый матрикс в области фибриллярных центров и нетранскрибируемых спейсеров.

предшественника наблюдается в фибриллярном компоненте; впоследствии меченая РНК выявляется в составе гранулярного компонента. Фибриллярный компонент ядрышка, таким образом, представляет собой первичный продукт транскрипции рибосомных генов (гигантскую молекулу-предшественник 45 S РНК в комплексе с белком), имеющий фибриллярную структуру. В ходе процессинга РНК эти фибриллярные структуры упаковываются в гранулы, которые и составляют гранулярный компонент ядрышка. Здесь происходят основные этапы созревания рРНК. Иногда в гранулярном компоненте выделяются светлые и темные гранулы, которые соответствуют разным стадиям процессинга (темные гранулы — промежуточная форма РНК, светлые гранулы — 28 S РНК).

Как уже говорилось, ядрышковый матрикс представляет собой плотно упакованные фибриллы (диаметром 5—7 нм) и гранулы; белковый состав «скелетного» ядрышкового матрикса (как и интерхроматинового) весьма гетерогенен и может отличаться у разных организмов. Так, в печени крыс идентифицированы полипептиды молекулярной массой от 30 до 82 кДа, у амфибий — 100-145 кДа и т. д. Однако существует группа высо-



коконсервативных белков, характерная для широкого круга объектов. (По мнению ряда исследователей, эти белки не следует относить непосредственно к компонентам ядрышкового матрикса.) Так, в фибриллярных центрах и в фибриллярном компоненте ядрышек обнаруживается белок С23, или нуклеолин, молекулярной массой около 110 кДа, содержащий 713 аминокислотных остатков. Это фосфопротеид, специфически окрашивающийся серебром. В его состав входит необычная аминокислота диметиларгинин. Он может связываться с РНК и гистонem Н1. *In vitro* в интактном виде нуклеолин ингибирует транскрипцию, а при фосфорилировании подвергается протеолитическому расщеплению, после чего может «убирать» гистон Н1 и разворачивать нуклеосомы. Во время митоза нуклеолин выявляется в ассоциации с ядрышковым организатором. По-видимому, он принимает участие в транскрипции и процессинге рРНК. Нуклеолин достаточно прочно связан со «скелетной» основой ядрышка.

В области фибриллярных центров у ряда организмов обнаружен также высококонсервативный белок фибрилларин, или В36, молекулярной массой 34 кДа. (В митотических клетках он локализуется в районе ядрышкового организатора.) Этот белок ассоциируется с пре-рРНК, но не с ДНК, связываясь, по-видимому, с только что синтезированной РНК и отвечая за ранние этапы процессинга. В гранулярном компоненте, где находятся зрелые формы рРНК, фибрилларин не обнаруживается.

К ядрышковому матриксу некоторые исследователи относят также белки, принимающие непосредственное участие в образовании предшественников рибосом. Идентифицировано несколько таких белков; они довольно консервативны. Один из них — кислый белок рибохарин (40 кДа). Он ассоциируется с предшественником большой субъединицы в гранулярном компоненте ядрышка, а затем заменяется белками, входящими в состав зрелых субъединиц. Связь рибохарина с полипептидами «скелетного» матрикса ядрышка неясна. В сборке рибосом участвует также фосфопротеид NO38 молекулярной массой 38 кДа, идентифицированный в печени крыс и амфибий.

Таким образом, в ядрышках функционирует целая группа высококонсервативных белков, каждый из которых, по-видимому, играет определенную роль в процессах образования рибосом. (Возможно, их стоит объединить под названием «функциональный матрикс» в отличие от гетерогенных белков, составляющих «скелетную» основу ядрышка — «структурный матрикс».)

В разных клетках существуют различные варианты морфологической организации ядрышка, которые обусловлены спецификой функционирования рибосомных генов в клетках данного типа и интенсивностью их работы на данном этапе жизнедеятельности клетки.

От этого зависит топографическое расположение компонен-



тов ядрышка. Например, гранулярный и фибриллярный компоненты могут быть перемешаны друг с другом, образуя так называемые компактные ядрышки; гранулярный компонент (иногда вместе с фибриллярным) может формировать тяжи, составляя «нуклеолонемное» ядрышко. В некоторых случаях фибриллярный компонент прилегает к внутриядрышковому хроматину и образует сердцевину ядрышка, а гранулярный компонент располагается по периферии в виде «коры» (ядрышки типа кора—сердцевина). Наконец, существуют так называемые кольцевые ядрышки, где центральная часть занята белками, а по периферии располагается гранулярный компонент. Такой вид приобретают ядрышки, завершающие функционирование (подробнее см. ниже).

При различных экспериментальных воздействиях или интенсификации работы рибосомных генов могут происходить существенные изменения в топографии ядрышковых структур и соотношении объема гранулярного и фибриллярного компонентов. Так, например, широко распространено своеобразное явление сегрегации ядрышек при различных воздействиях на клетку, которое заключается в перераспределении гранулярного и фибриллярного компонентов в тех ядрышках, где они изначально были распределены диффузно. Происходит их специфическое объединение в две четко разграниченные зоны.

Морфологические картины перераспределения структурных компонентов ядрышка отражают изменения интенсивности синтеза РНК, ее процессинга и внутриядрышкового транспорта. Перечисленные процессы можно разобщить с помощью специфических ингибиторов. При этом на фоне действия того или иного ингибитора происходят соответствующие изменения в структуре ядрышка. Например, если ингибировать синтез РНК актиномицином Д, то наблюдается сегрегация ядрышка с образованием темной и светлой зон (шапочек), состоящих из соответствующих типов гранулярного компонента. Фибриллярный компонент при этом, естественно, исчезает. Если ингибировать и синтез РНК, и процессинг (с помощью тойокамицина), то происходит полная сегрегация ядрышка: фибриллярный компонент исчезает, светлый гранулярный компонент выходит в цитоплазму, остается лишь темный гранулярный компонент.

Если ингибировать синтез РНК, не блокируя процессинг, то сегрегированное ядрышко приобретает структуру, характерную в норме для кольцевых ядрышек. Отсюда видно, что при завершении функционирования ядрышка перестает формироваться фибриллярный компонент, а гранулярный компонент сосредоточивается по периферии ядрышка и постепенно транспортируется в цитоплазму.

При такого рода воздействиях, очевидно, изменяется не только распределение РНП, но и укладка ДНП ядрышкового организатора и белков матрикса.



О большой функциональной и филогенетической пластичности ядрышкового аппарата в клетках эукариот свидетельствует такое поразительное явление, как амплификация ядрышкового организатора, обнаруженная в ооцитах многих групп животных, в частности амфибий и рыб. Биологическая сущность этого процесса заключается в том, что в ооцитах резко (от 100 до 1000 раз) увеличивается количество функционирующих генов, кодирующих рибосомную РНК. Оно достигается путем образования множества небольших кольцевых молекул ДНК, содержащих только рибосомные гены. Каждая молекула ДНК формирует дополнительные функционирующие ядрышки, расположенные обычно по периферии ядра. Морфологически процесс амплификации выражается в следующем: на ранних стадиях профазы мейоза в ядре ооцитов амфибий и рыб наблюдается формирование фельген-положительного материала — так называемой гетерохроматиновой шапочки. Она представляет собой экстрахромосомную ДНК, на основе которой и происходит формирование многочисленных ядрышек, не связанных с хромосомой. Экстрахромосомная ДНК не участвует в делении ядра. В ооцитах насекомых эта ДНК может функционировать без образования отдельных экстрахромосомных ядрышек.

Механизм амплификации остается в значительной мере не выясненным, однако не подлежит сомнению, что амплификация носит каскадный характер, т. е. копии кольцевых молекул ДНК подвергаются повторной репликации. Выяснение механизма амплификации представляет большой общецитологический интерес, поскольку это явление, по-видимому, характерно не только для рибосомных генов. Так, существуют сведения об амплификации структурных генов при дифференцировке тканей у растений. Недавно была показана амплификация генов, кодирующих белки хориона в оогенезе дрозофилы. Широкое распространение явления амплификации и увеличения таким путем дозы генов показано сейчас на многих объектах, в частности на культивируемых *in vitro* клетках. Амплифицироваться могут разные гены — кодирующие ферменты для разрушения антиметаболитов, мембранные белки, образующие каналы, через которые удаляются вредные вещества (см. ниже) и др. Использование аналогичных процессов умножения генов в еще большей степени, чем в социтах, обнаружено при образовании макронуклеуса у брюхоресничных инфузорий рода *Stylonichia* (рис. 87). После конъюгации и гибели старых макронуклеусов новый формируется у этих инфузорий из микронуклеуса следующим способом. Вначале осуществляется политенизация хромосом. Затем некоторые участки политенных хромосом проходят один или несколько циклов дополнительной репликации. Значит, эти участки молекул ДНК в геноме представлены большим числом копий, чем основная масса ДНК. На следующем этапе происходит разрезание хромосом с помощью эндонуклеаз на короткие от-



резки; до 93% ДНК подвергается гидролизу и деградирует. Остающиеся 7% ДНК полиплоидного генома вновь многократно реплицируются, что приводит к формированию дефинитивного макронуклеуса. Многократно реплицированные гены обеспечивают мощный поток информации, необходимый для создания большого трансляционного аппарата макронуклеуса.

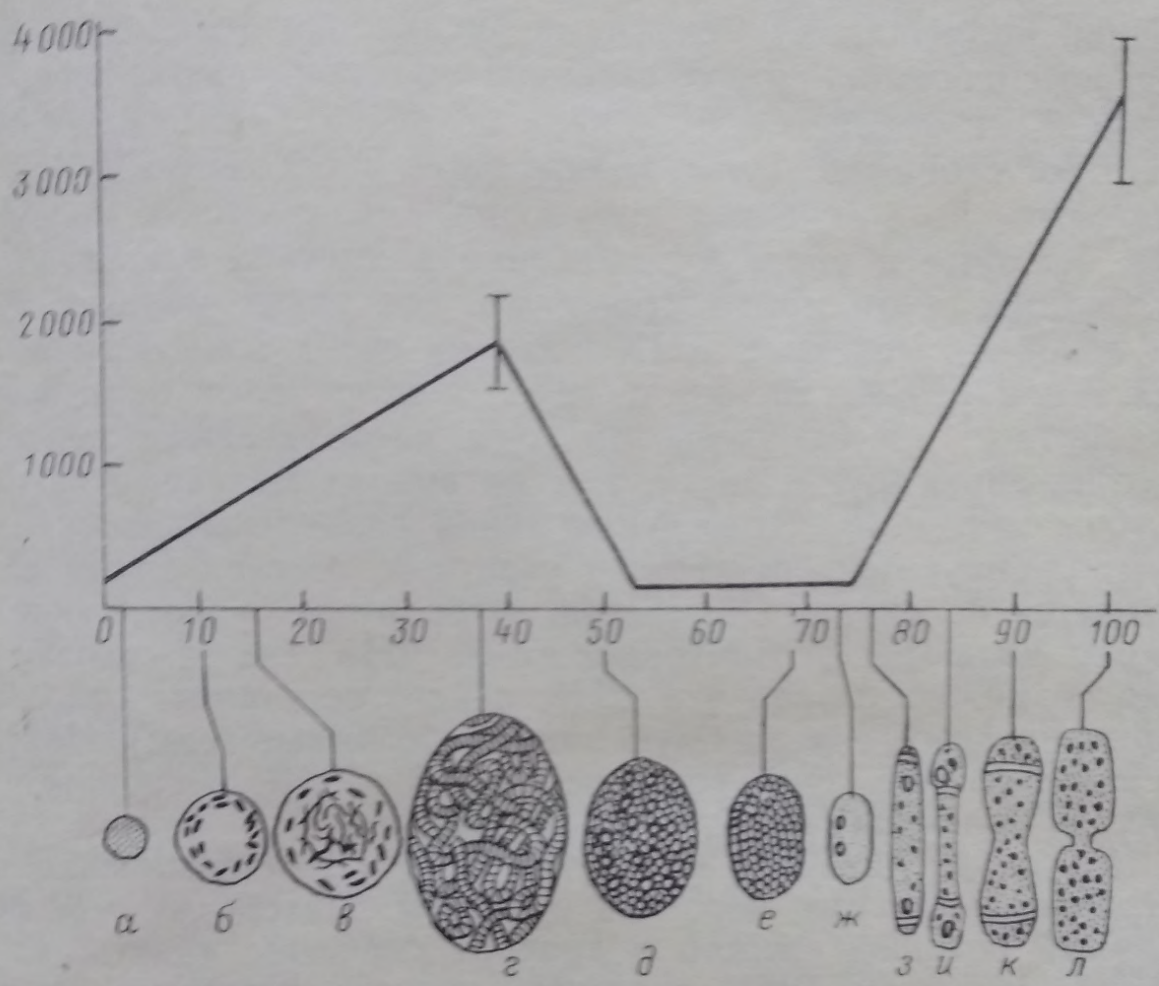


Рис. 87. Изменение количества ДНК при развитии макронуклеуса из микро-нуклеуса брюхохоресничных инфузорий (по: Райков, 1978).

По оси абсцисс — возраст зачатка, ч, по оси ординат — содержание ДНК, усл. ед. а-л — стадии развития зачатка: а — дериват синкариона; б — зачаток с конденсированными хромосомами; в — деконденсация части хромосом и начало их политенизации; г — максимальное развитие политенных хромосом; д, е — стадия пузырьков после фрагментации политенных хромосом; ж — появление первых ядрышек; з-к — вторая фаза синтеза ДНК (с участием репликационных полосок); л — разделение зачатка на два дефинитивных макронуклеуса.

Однако такие сложные преобразования в геноме макронуклеусов инфузорий оказываются возможными лишь в связи с тем, что макронуклеус освобожден от генеративной функции. В тех же случаях, когда генеративная функция за геномом сохраняется полностью (как в ооцитах и в большинстве других эукариотных клеток), на способы регуляции работы генетического аппарата клеток накладываются существенные ограничения. Даже в ооцитах механизм амплификации используется лишь для интенсификации синтеза 18, 5,8 и 28 S РНК, а соот-



ветствующее увеличение количества 5 S рРНК и транспортных РНК, нужных для усиленного синтеза белка, достигается иными способами. Для синтеза 5 S рРНК в геноме амфибий в составе хромосом есть специальные гены, активирующиеся лишь в ооцитах. Необходимое количество транспортных РНК обеспечивается интенсификацией работы обычных хромосомных генов. В отличие от других позвоночных у амфибий в геноме количество последних повышено в несколько раз.

Иная модификация механизма увеличения дозы рибосомных генов по сравнению со свойственной ооцитам разных групп животных была недавно обнаружена в клетках миксومیцета *Physarum polyserphalum*. Гены, кодирующие рибосомную РНК, располагаются не в основной хромосоме, а в линейных молекулах ДНК, которые и образуют ядрышко в клетках слизевика. На гаплоидный геном приходится около ста таких молекул. Каждая линейная молекула ДНК несет на своих концах группу из трех генов рРНК: 26, 5,8 и 19 S. В отличие от большинства эукариотных клеток здесь эти гены располагаются зеркально по отношению друг к другу, т. е. на концах молекулы находятся гены 26 S РНК. Эти группы генов разделены большим нетранскрибируемым спейсерным участком, составляющим основную часть молекулы. По мнению авторов этих работ, такие молекулы являются экстрахромосомной ДНК (не исключена однако возможность, что эта ДНК просто составляет отдельную минихромосому, содержащую лишь рибосомные гены). Интересно отметить, что гены, кодирующие 5 S рРНК, расположены в этих же молекулах ДНК, но на другой нити.

На концах линейной молекулы ДНК у *Physarum* находятся нетранскрибируемые короткие спейсеры. Интересно, что центральный большой спейсер и краевые спейсеры имеют нуклеосомную структуру ДНК, а активно транскрибируемые два участка рибосомных генов ее утрачивают.

Репликация молекул экстрахромосомной ДНК происходит независимо от репликации хромосомной ДНК, в основном в периоде G<sub>2</sub>. Можно экспериментально разобщить репликацию экстрахромосомной и хромосомной ДНК без нарушения жизнедеятельности клеток. Экстрахромосомная рДНК миксомикетов присутствует в клетках постоянно, причем ее количество на геном поддерживается на одном уровне. Механизмы равномерного распределения этой рДНК во время митоза остаются совершенно не ясными. Неизвестно также, существуют ли у слизевиков гены рРНК в составе основных хромосом и если существуют, то в каких взаимоотношениях они находятся с молекулами экстрахромосомной рДНК. Сходные по организации молекулы экстрахромосомной рДНК обнаружены в макронуклеусе инфузорий тетрахимен. В этом случае рДНК находится только вне хромосом.

Наличие молекул специфической постоянной экстрахромо-



сомной рДНК у миксомицетов и инфузорий свидетельствует о многообразии и пластичности организации генома эукариотных клеток; эти объекты представляют собой интересные модели для изучения элементарных механизмов транскрипции рДНК.

Большие успехи достигнуты и в изучении организации генов, кодирующих тРНК у эукариот.

Количество генов тРНК в эукариотных клетках варьирует от нескольких сотен до нескольких тысяч, т. е. они представлены умеренно повторяющимися последовательностями. Как правило, у низших эукариот их меньше, чем у высших. Однако, если у амфибий количество генов тРНК может достигать 7800 на гаплоидный геном, то у дрозофилы и человека оно составляет соответственно 900 и 1310.

Увеличение количества генов тРНК в клетках отдельных групп организмов может быть обусловлено функциональными причинами (особенностями оогенеза, наличием органов, секретирующих большое количество белков со специфическим набором аминокислот и т. д.). Гены, кодирующие тРНК, характеризуются значительным консерватизмом. Например, у таких филогенетически отдаленных организмов, как человек и дрозофила, гены тРНК отличаются либо небольшими нуклеотидными последовательностями, либо вообще не обнаруживают различий (ген лизиновой тРНК). Распределение генов тРНК варьирует в клетках разных организмов. Они могут быть собраны в кластеры, содержащие копии однородных или разных генов, а могут быть более или менее равномерно распределены по всему геному. Гены тРНК могут располагаться в обеих нитях ДНК и ориентироваться в двух направлениях. Их разделяют спейсеры неодинаковой длины, негомлогичные друг другу. Гены многих тРНК содержат интрон, т. е. при созревании тРНК происходит сплайсинг. Участки ДНК, которые узнаются факторами транскрипции и РНК-полимеразой и обеспечивают инициацию транскрипции тРНК, находятся внутри генов тРНК (как и в генах 5 S РНК).



## РЕПРОДУКЦИЯ КЛЕТОК

## 5.1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Процессы деления эукариотных клеток привлекают внимание ученых уже более ста лет. В них отчетливо проявляется функциональная роль как отдельных клеточных систем, так и общеклеточных интегративных механизмов.

Уже в 50-е годы XX в. было сделано очень крупное обобщение данных о процессах репродукции: создано учение о митотических циклах эукариотных клеток. Оно базировалось на представлении о том, что один из важнейших процессов репродукции — удвоение наследственной информации клеток, репликация ДНК — совершается в течение особого периода интерфазы. В связи с этим репродукцию клеток уже нельзя было рассматривать как весьма кратковременный процесс собственно митоза, когда осуществляется равнонаследственное распределение хромосом между дочерними клетками. В ходе репродукции не менее важное значение имеют и события, происходящие в интерфазе (образование двойного набора хромосом и другие процессы, которые не удавалось выявить классическими морфологическими методами).

По современным представлениям типичный митотический цикл клетки состоит из четырех периодов: пресинтетического ( $G_1$ ), периода синтеза ДНК (S), постсинтетического ( $G_2$ ) и митоза (M), закономерно и последовательно сменяющих друг друга. По морфологическим и биохимическим критериям наиболее четко можно охарактеризовать S-период и митоз. В последнем выделяют пять фаз: профазу, прометафазу, метафазу, анафазу и телофазу, в каждой из которых совершаются вполне определенные процессы (формирование митотических хромосом, разборка ядрышка и поверхностного аппарата ядра, перемещение дочерних хромосом к полюсам веретена и деспирализация хромосом с образованием поверхностного аппарата и ядрышек у дочерних ядер). После разделения ядер — кариокинеза — в слу-



чае типичного митоза происходит деление цитоплазмы — цитотомия.

Характерной особенностью организации процессов, осуществляющихся в митозе, как и в других периодах цикла репродукции, является отсутствие жесткой причинно-следственной взаимосвязи между отдельными звеньями этих процессов. Так, прохождение клеткой одной из фаз митотического цикла не обязательно влечет за собой вступление клетки в следующую фазу. Обусловленная этим пластичность процессов репродукции лежит в основе естественной соматической полиплоидизации при дифференцировке клеток многоклеточных животных. Пластичностью процесса репродукции определяется и возможность полового размножения, в основе которого лежит редукционное деление мейоза половых клеток, где оказываются разобщенными главные процессы клеточной репродукции: митотическое деление и синтез ДНК.

Тем не менее, как правило, события, происходящие во время клеточного цикла в целом и каждой его фазы, осуществляются строго последовательно, что свидетельствует о наличии у клеток весьма совершенных интегративных механизмов, которые и обуславливают закономерное протекание множества сложных полуавтономных процессов цикла репродукции.

## 5.2. ИНТЕРФАЗНЫЕ ПЕРИОДЫ ЦИКЛА РЕПРОДУКЦИИ ЭУКАРИОТНЫХ КЛЕТОК

В каждом периоде интерфазы в клетках выявляются характерные структурно-биохимические изменения. Уже в начале 60-х годов на ряде эукариотных клеток удалось показать, что в ходе интерфазы меняется соотношение скорости роста ядра и цитоплазмы. В периоде  $G_1$  наблюдается преимущественный рост цитоплазмы клеток. В периоде  $S$ , наоборот, главным образом увеличивается объем ядра, к периоду  $G_2$  происходит замедленное, но гармоничное возрастание объема ядра и цитоплазмы.

Позднее появились данные, свидетельствующие об изменениях поверхностного аппарата клетки в ходе митотического цикла. Эти работы были выполнены в основном на культивируемых *in vitro* фибробластах млекопитающих. В периоде  $G_1$  клетке, прикрепленные к субстрату, имеют на наружной поверхности множество коротких микроворсинок (рис. 88). В периоде  $S$  клетка максимально расплывается по субстрату, а отростки на ее поверхности становятся тонкими и длинными. В периоде  $G_2$  отростки клеточной поверхности еще больше удлиняются и истончаются, а степень расплывания клетки по субстрату уменьшается. В митозе клетка округляется и сохраняет связь с субстратом лишь с помощью очень тонких и длинных отростков; на поверхности клетки, как и в периоде  $G_2$ , обнаруживаются многочисленные микроворсинки. С помощью лектинов



удалось показать, что в ходе митотического цикла изменяется и распределение конканавалиновых рецепторов на поверхности фибробластов.

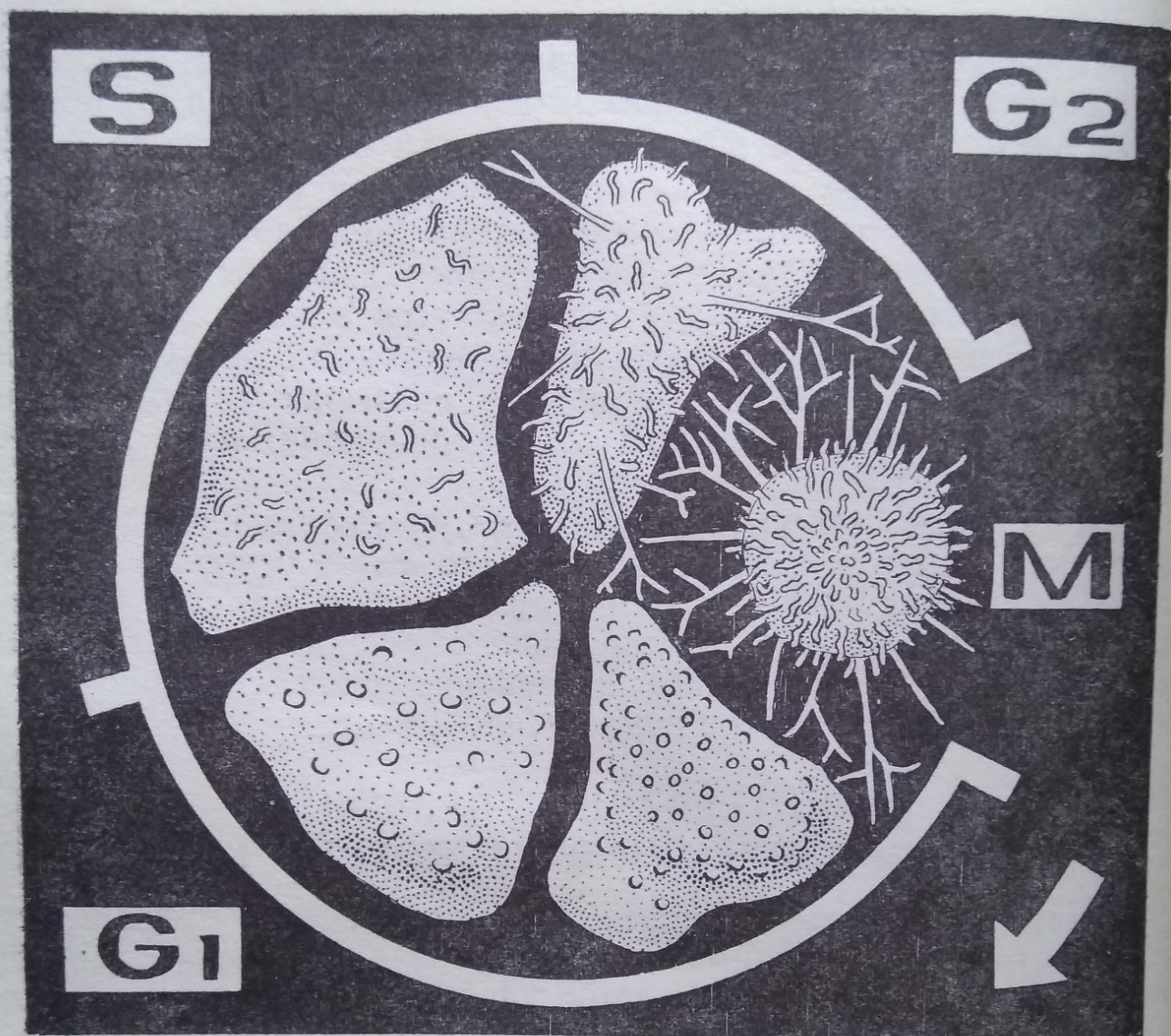


Рис. 88. Изменение клеточной поверхности фибробластов млекопитающих, культивируемых *in vitro*, в ходе клеточного цикла (по: Мэзия, 1963).

M, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> — периоды клеточного цикла.

В течение митотического цикла происходят также и закономерные изменения метаболизма клеток. Каждый период цикла характеризуется существенными особенностями синтеза и внутриклеточного транспорта важнейших макромолекул. Так, основное событие периода S — репликация ДНК.

Процессы репликации ДНК в общем сходны у про- и эукариот, но имеют и ряд существенных различий, связанных с особенностями организации ядерного аппарата эукариот — большими размерами молекулы ДНК, наличием нуклеосом и сложных структур ядерного матрикса и т. д. Так, скорость синтеза ДНК у эукариот примерно на порядок ниже, чем у прокариот (у последних она составляет около 1000 нуклеотидов в секунду).



Молекулярные механизмы репликации ДНК детально изучены у прокариот и подробно обсуждаются в специальных руководствах по молекулярной биологии; мы остановимся на вопросах, касающихся структурной организации этих процессов.

Репликация генома прокариот происходит по унирепликонному типу: в их кольцевой хромосоме существует только одна точка инициации (ориджин, от англ. origin — начало) репликации, где возникают репликативные вилки. Процесс продолжается до тех пор, пока не удвоится вся ДНК; бактериальная хромосома, таким образом, представляет собой единицу репликации — репликон.

Геному эукариот свойственна мультирепликонная организация: хромосома может иметь несколько десятков или сотен ориджин репликации. Расстояние между точками репликации и длина репликонов у эукариот значительно варьируют (скорость репликации и длину репликона можно определить с помощью автордиографии нитей ДНК на стекле).

Процессы инициации репликации строго регулируются: каждый ориджин в данном цикле репликации (S-периоде) функционирует только один раз. Инициация репликации разных репликонов, так же как и ее терминация, может происходить в разное время, т. е. один репликон начинает реплицироваться в начале S-фазы, другие — в середине, третьи — в конце. Эта особенность организации генома эукариотных клеток обуславливает так называемую асинхронность репликации ДНК. Она наблюдается как в разных хромосомах, так и в пределах одной хромосомы. Степень асинхронности синтеза ДНК в разных репликонах находится, по-видимому, под контролем интегративных клеточных организмов, природа которых в настоящее время неясна. Благодаря всему этому возможна регуляция длительности периода S в широких пределах.

Показано, например, что в стадии дробления у многих животных инициация репликации во всех репликонах происходит почти одновременно, что определяет сравнительно небольшую длительность периода синтеза ДНК. По мере развития зародыша степень асинхронности репликации ДНК в дифференцирующихся клетках резко увеличивается, что приводит к возрастанию длительности периода синтеза ДНК. Обнаружено, что в некоторых клетках удвоение репликонов эухроматина приходится на начало периода S; степень асинхронности репликации отдельных репликонов здесь обычно невелика, что и определяет быстрое завершение процесса. Однако в некоторых случаях, например, при синтезе ДНК, предшествующем первому делению мейоза, репликация отдельных репликонов может смещаться на период профазы мейоза. Это играет, по-видимому, существенную роль в процессах конъюгации гомологичных хромосом и в процессах кроссинговера.



В процессах репликации ДНК важная роль принадлежит ядерному матриксу. Так, при импульсном мечении включение  $^3\text{H}$ -тимидина (до 90%) обнаруживается во фракции ДНК, связанной с матриксом, т. е. участки ДНК при репликации образуют связи с ядерным скелетом. В ассоциации с фиброгранулярным компонентом интерхроматинового матрикса выявляются ферменты репликации — ДНК-полимераза III, ДНК-праймаза и топоизомеразы. (В печени крысы с ядерным матриксом связано около 70% ДНК-полимеразы, 60% топоизомеразы и 40% ДНК-праймазы.)

Со «скелетными» белками прочно связаны точки инициации репликации (ориджины); в ассоциации с интерхроматиновым матриксом выявляются также и репликативные вилки (см. рис. 105). По мнению многих исследователей, некоторые ферменты, участвующие в репликации, объединяются в особые структуры — реписомы, ассоциирующиеся с ядерным матриксом.

Помимо репликации ДНК в периоде S происходит интенсивный синтез и поступление в ядро гистонов, необходимых для обеспечения нуклеосомной упаковки вновь синтезированной ДНК. Различные фракции гистонов претерпевают в интерфазе существенные изменения. В частности, по мере прохождения клетками отдельных фаз митотического цикла происходит фосфорилирование гистонов H1: одна фосфатная группа присоединяется во второй половине периода  $G_1$ , другая — в начале периода S, а третья — в конце периода  $G_2$ . Эти процессы обуславливают, очевидно, изменения свойств ДНП по ходу митотического цикла, которые могут быть выявлены и цитохимическими, и экспериментально-цитологическими методами. Так, в разные периоды цикла репродукции обнаружено закономерное изменение окрашиваемости ядер и хроматина, доступности ДНК для атаки ДНКазами и степени связывания ею различных агентов, в том числе актиномина Д. Максимальная «открытость» ДНК для этих процессов обнаруживается в конце  $G_1$  и в начале S-периода.

Особенно интересные данные в этом плане получены в экспериментально-цитологических исследованиях на гибридных клетках двух разных линий (рис. 89). С помощью колхицина деление клеток одной из линий блокировали на стадии метафазы. Затем такие клетки гибридизировали с клетками другой линии, находящимися в разных периодах интерфазы. В гибридных клетках происходит разборка оболочки интерфазных ядер и формирование хромосом, при этом структура образующихся хромосом специфична для каждого периода цикла. Наиболее длинные слабоспирализованные хромосомы характерны для клеток, находящихся на стадии  $G_1$ . Хромосомы, образующиеся в периоде S, короче и содержат как реплицированные, так и нереплицированные участки. Самые компактные хромосомы обнаруживаются в периоде  $G_2$ , но они еще в 1,5—2 раза длиннее



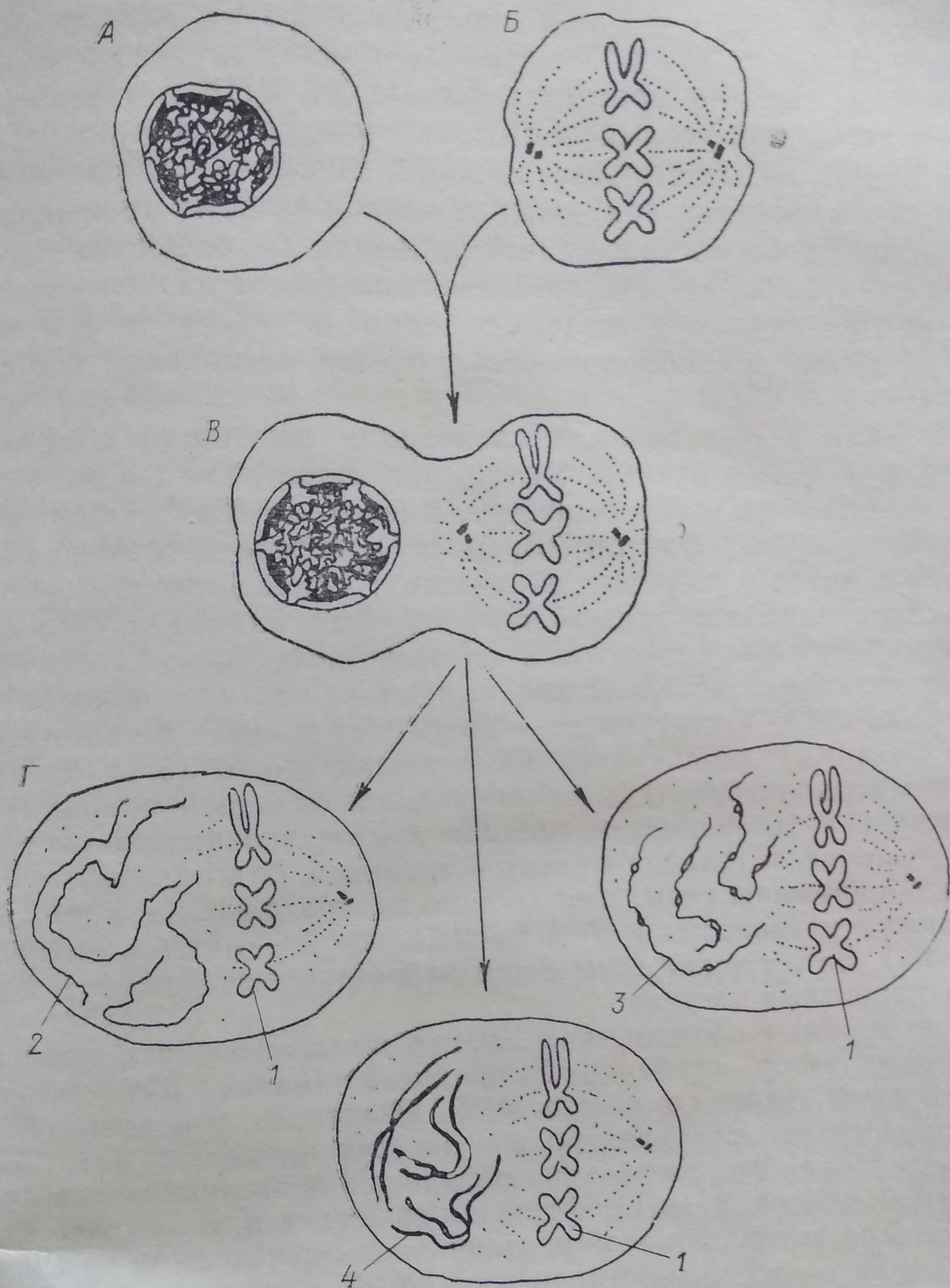


Рис. 89. Гибридизация клеток, находящихся на разных стадиях клеточного цикла.

А, Б — клетки на стадии интерфазы (А) и метафазы (Б); В — гибридная клетка сразу (В) и через некоторое время после слияния (Г). 1 — метафазные хромосомы; 2—4 — конденсированные хромосомы клеток, взятых на стадиях  $G_1$  (2), S (3) и  $G_2$  (4).

зрелых метафазных хромосом. В хромосомах клеток, находящихся во второй половине  $G_2$ -периода, с помощью специальных методов окраски можно выявить диски, характерные для метафазных хромосом (см. ниже).

Результаты этих опытов свидетельствуют об отсутствии



жестких причинно-следственных взаимоотношений между отдельными звеньями цикла репродукции. Об этом говорит возможность разборки ядерной оболочки и формирования митотических хромосом в любом периоде цикла; следовательно, эти события не связаны прямо с репликацией ДНК и другими биохимическими процессами подготовки клетки к делению. С другой стороны, события, протекающие в митотическом цикле, строго скоординированы. Так, деление клетки в норме не начинается до тех пор, пока не завершится удвоение хромосом; для вступления в митоз принципиальное значение имеет размер клетки — она не приступает к делению, пока ее масса не удвоилась и т. д. Каким же образом регулируется вступление клетки в митоз?

Начиная с 70-х годов, исследования регуляции клеточного цикла шли двумя путями. Биохимики обнаружили в мейотических ооцитах лягушки вещество, названное MPF (maturation promoting factor — фактор созревания), которое способно индуцировать мейоз у незрелых яйцеклеток; затем активный фактор, стимулирующий вступление в митоз, был найден у дрожжей, ряда морских беспозвоночных (в том числе морских ежей) и млекопитающих. Впоследствии выяснили, что активность MPF в течение цикла флуктуирует — пропадает в интерфазе и проявляется в митозе, подчиняясь действию какого-то цитоплазматического осциллятора (как предполагали, белковой природы).

Второй путь анализа регуляции клеточного цикла — это генетические исследования мутантов дрожжей, благодаря которым были обнаружены гены, отвечающие за прохождение клеточного цикла и названные *cdc* (cell division cycle — цикл клеточного деления). Затем такие гены были найдены у человека и в других эукариотных клетках.

Эти подходы объединились, когда выяснилось, что продукт одного из генов — гена *cdc2* дрожжей (белок  $p34^{cdc2}$ , или просто *cdc2*) входит в состав MPF. Оказалось, что этому белку принадлежит ключевая роль в запуске процессов митотического деления. Это очень консервативная протеинкиназа молекулярной массой 34 кДа, функционирующая и в митозе, и в мейозе. Для активации этой протеинкиназы необходимо ее взаимодействие со вторым компонентом MPF — циклином. Циклины также весьма консервативные белки, их количество флуктуирует в течение клеточного цикла: они накапливаются в интерфазе и исчезают в митозе. (Циклины образуются с постоянной скоростью, но в митозе быстро деградируют, а в интерфазе расщепляются медленнее, чем синтезируются.) Комплекс *cdc2*-циклин, который образуется в фазе  $G_2$ , в свою очередь должен быть активирован; белки, регулирующие деятельность этого комплекса, могут различаться у разных организмов. Так, у дрожжей и двукрылых эту функцию выполняет белок *cdc25*. Протеинкиназа *cdc2* в составе активированного комплекса фос-



форилирует ряд клеточных белков (в том числе гистон H1 и ламинины), запуская процессы, приводящие в итоге к разборке ядерной оболочки, конденсации хромосом и сборке веретена, а также активирует ферменты, вызывающие деградацию циклинов.

Показано, что cdc 2 стимулирует реорганизацию цитоскелета и блокирует цитоплазматический везикулярный транспорт. Эти явления характерны и для клеток *in vivo* — в митотическом цикле происходит перестройка тубулинового цитоскелета (см. ниже), разборка актиновых стресс-фибрилл (и полная дезинтеграция миофибрилл в поперечнополосатых мышечных волокнах) и остановка процессов цитоплазматического мембранного транспорта, в том числе интернализации и рециклирования рецепторов.

В митозе наблюдается и фрагментация мембранных структур. Как указывалось выше, ядерная оболочка разбирается на мелкие пузырьки; ламинины плотной пластинки образуют в цитоплазме глобулы с константой седиментации 4—9 S, при этом ламин B остается связанным с пузырьками — дериватами ядерной оболочки — и, вероятно, обуславливает ее сборку в телофазе. Аппарат Гольджи, а в некоторых типах клеток и ЭПС также фрагментируются в митозе (возможно, для более равномерного распределения между дочерними клетками). Детали этих процессов, так же как и механизмы регуляции клеточного цикла, до сих пор остаются в значительной мере невыясненными.

### 5.3. ОРГАНИЗАЦИЯ ХРОМОСОМ В ТИПИЧНОМ МЕТАЗОЙНОМ МИТОЗЕ

Организация метафазных хромосом — одна из центральных проблем репродукции клеток. Этот вопрос имеет и самостоятельное значение, поскольку число, размеры и морфология хромосом, составляющих кариотип данного вида, служат наиболее характерным видовым признаком. Размеры хромосом разных видов сильно варьируют: от едва различимых в световом микроскопе (0,2 мкм) до относительно крупных образований (50 мкм). Количество хромосом также изменяется в широких пределах (от 2—4 до 1000—1600).

Типичная метафазная хромосома обычно имеет один центромерный участок — так называемую зону первичной перетяжки, которая делит хромосому на два равных или неравных плеча (метацентрические и субметацентрические хромосомы). В области первичной перетяжки расположена центромера — участок хромосомы, где образуется особая структура — кинетохор, с которым связаны кинетохорные микротрубочки митотического аппарата (рис. 90, А, Г). В центромерных участках хромосомы у многих видов локализована сателлитная ДНК.



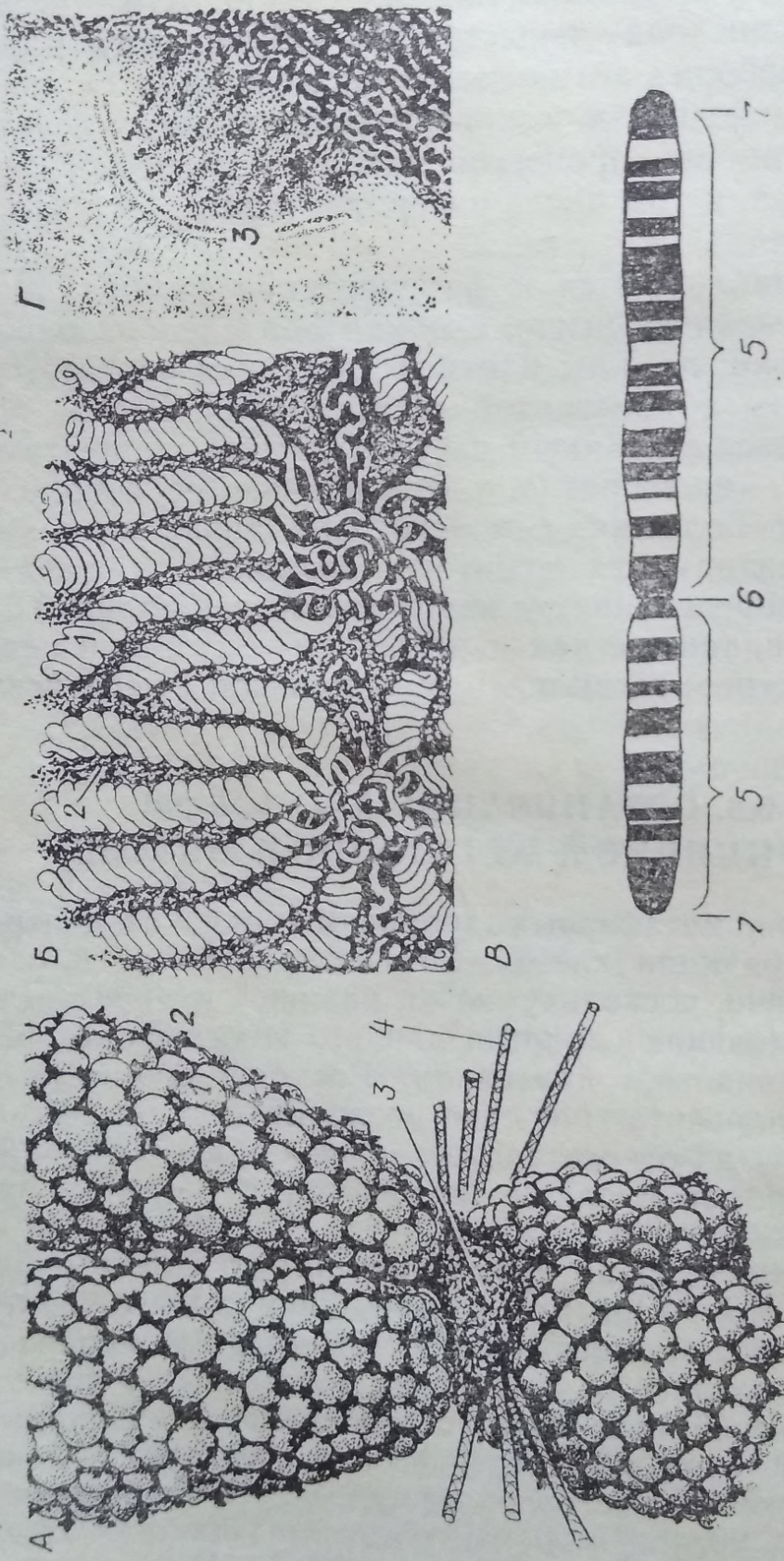


Рис. 90. Организация метафазной хромосомы.

А — объемная схема, Б — вид в световом микроскопе после дифференциального окрашивания, Г — область кинетохора. 1 — плотно упакованные нуклеомерные тяды ДНП, 2 — элементы матрикса, 3 — кинетохор, 4 — кинетохорные микротрубочки, 5 — плечи, 6 — центромерный и 7 — теломерные участки хромосом.



у некоторых хромосом в каждом кариотипе есть вторичная перетяжка, в области которой сосредоточены околядрышковый гетерохроматин и гены, кодирующие рибосомную РНК, т. е. ДНП ядрышкового организатора. Плечи хромосом оканчиваются теломерными участками, где у многих видов животных и растений также может быть локализована сателлитная ДНК.

В практике хромосомного анализа на уровне световой микроскопии широко используются методы дифференциального окрашивания. В этих условиях избирательно прокрашиваются отдельные участки хромосом (рис. 90, В). Молекулярные механизмы дифференциального окрашивания пока неясны. Тем не менее данный метод (banding — от англ. band — полоса) широко используется в кариосистематике и медико-биологических исследованиях хромосом человека.

Наличие множественных полос, или дисков, в митотических хромосомах, свидетельствующих о закономерной укладке гетерохроматиновых участков генома, составляет особенность организации хромосом даже далеко отстоящих друг от друга организмов. Например, в кариотипах шимпанзе, гориллы, orangутанга и человека (несмотря на различие в количестве хромосом) наблюдается сходный рисунок распределения ДНП в гомологичных хромосомах.

Тем не менее функциональное значение этих структур остается неясным, поскольку даже самые тонкие полосы образованы по меньшей мере 30 спирализованными гигантскими петлями ДНП и содержат не менее одного миллиона нуклеотидов. Закономерное распределение полос или дисков по длине митотических хромосом указывает на существование еще одного или нескольких высших уровней упаковки ДНК, по-видимому, универсальных для всех эукариотных клеток. На это указывал еще в конце 70-х годов известный цитолог А. Лима де Фариа в своем учении о хромосомных полях. По его заключению функционально аналогичные участки генома у самых разных организмов распределяются в митотических хромосомах не случайным образом, а вполне закономерно и сходно по отношению к центральному участку хромосом.

Как говорилось выше, в упаковке ДНП в митотических хромосомах принимают участие белки ядерного матрикса. Если с помощью NaCl высокой концентрации из метафазной хромосомы удалить гистоны, то происходит деконденсация хромосом и образуется структура, осевая часть которой сохраняет форму метафазной хромосомы; от этого остова отходят многочисленные петли ДНК (30-нм фибриллы). Остов (скаффолд) хромосомы и составляют белки ядерного матрикса. Часть белков скаффолда митотических хромосом идентична белкам интерхроматинового матрикса (например, белки 71, 53 и 47 кДа у млекопитающих). У миксомицета *Physarum polycephalum* прослежен постепенный переход матрикса в скаффолд митотических



хромосом при их формировании в митотическом цикле. В остове метафазных хромосом в большом количестве обнаруживается топоизомераза II.

Особый интерес для понимания закономерностей упаковки ДНП представляют те модификации организации белков ядерного матрикса, которые наблюдаются в профазе мейоза. Здесь белки матрикса образуют связующую структуру между гомологичными удвоенными хромосомами — так называемый синаптонемальный комплекс (рис. 91), обеспечивающий объединение гомологичных хромосом на протяжении определенного периода профазы мейоза.

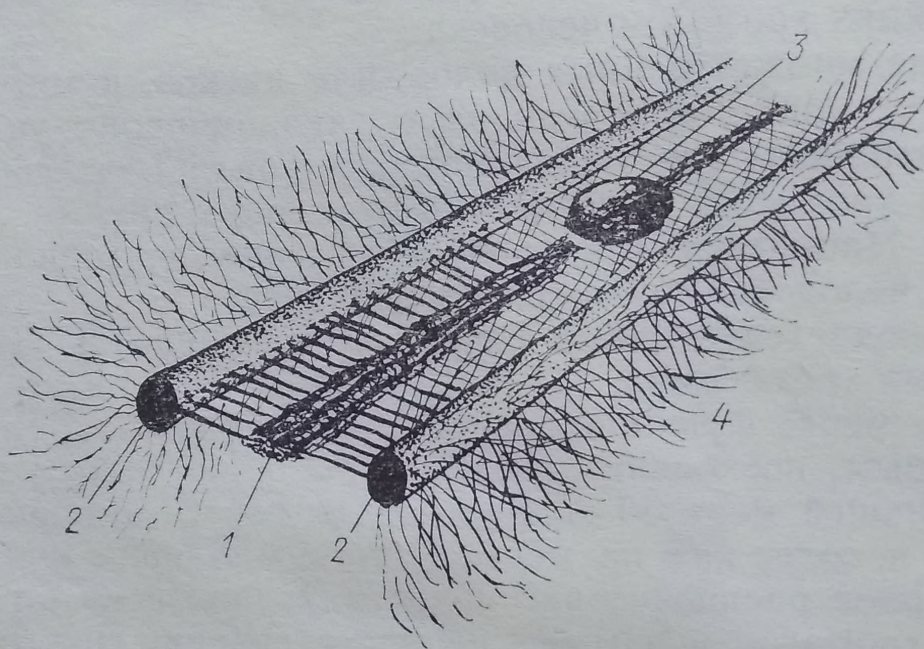


Рис. 91. Синаптонемальный комплекс.

1 — центральный и 2 — латеральные элементы синаптонемального комплекса; 3 — рекомбинационный узелок, 4 — хроматин сестринских хроматид.

Кроме белков ядерного матрикса и ДНП в составе митотических хромосом обнаружено относительно большое количество РНП, расположенного в виде сплошного слоя гранулярных и фибриллярных образований по периферии хромосомы. Появление этого слоя совпадает с исчезновением ядрышка.

#### 5.4. ОСНОВНЫЕ КИНЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ МИТОЗА И ОРГАНИЗАЦИЯ МИТОТИЧЕСКОГО АППАРАТА

К основным кинетическим процессам типичного метазойного митоза относятся: 1) расхождение центриолей к противоположным полюсам клетки; 2) перемещение формирующихся в профазе хромосом в область экватора и образование метафазной пластинки; 3) анафазное расхождение дочерних хромосом к противоположным полюсам клетки; 4) цитотомия и возникновение двух дочерних клеток (рис. 92, 93).



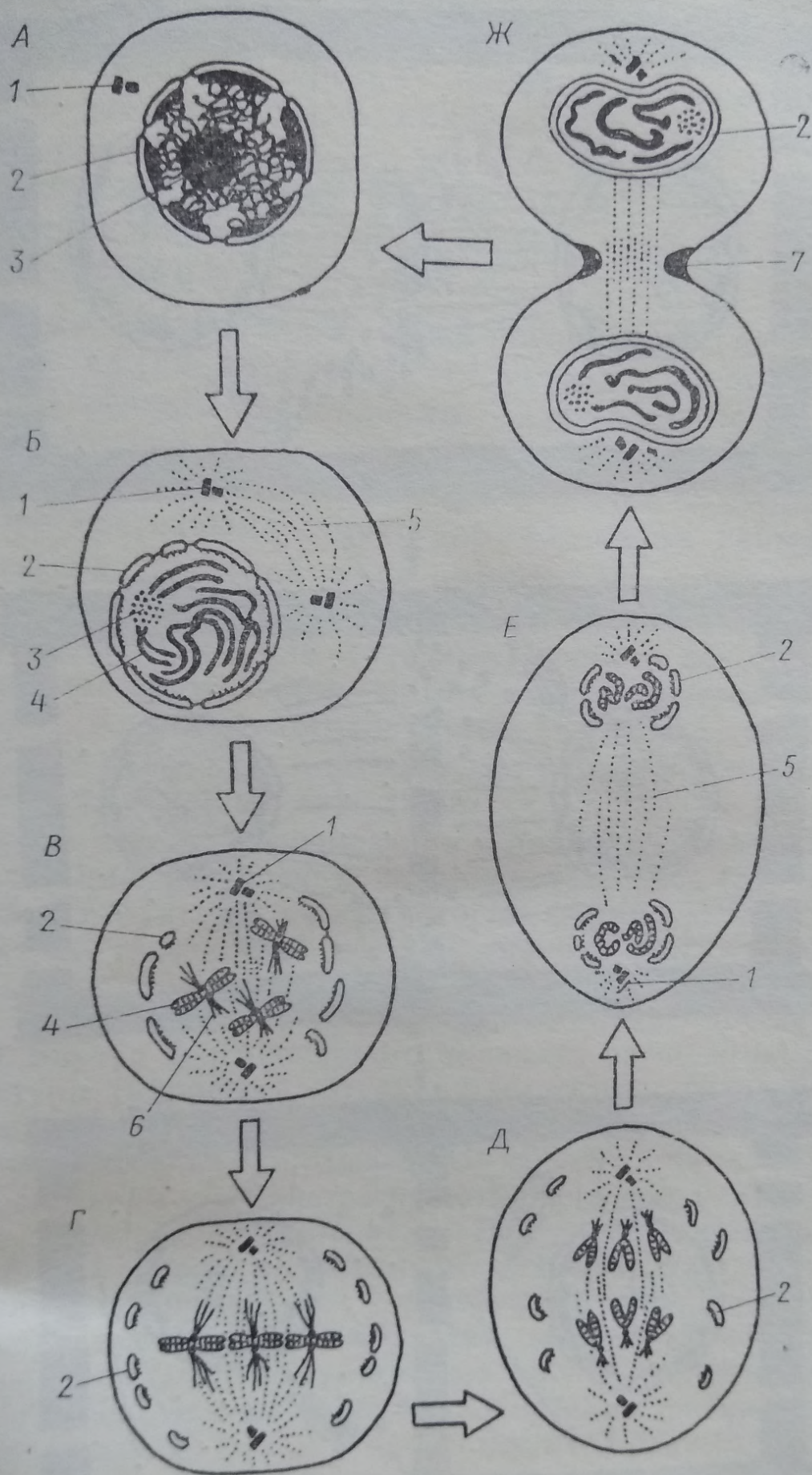


Рис. 92. Митоз животной клетки.

А — интерфаза, Б — профаза, В — прометафаза, Г — метафаза, Д — анафаза, Е — телофаза, Ж — цитотомия. 1 — центриоль, 2 — ядерная оболочка, 3 — ядрышко, 4 — хромосомы, 5 — микротрубочки веретена, 6 — кинетохорные микротрубочки, 7 — область перетяжки.



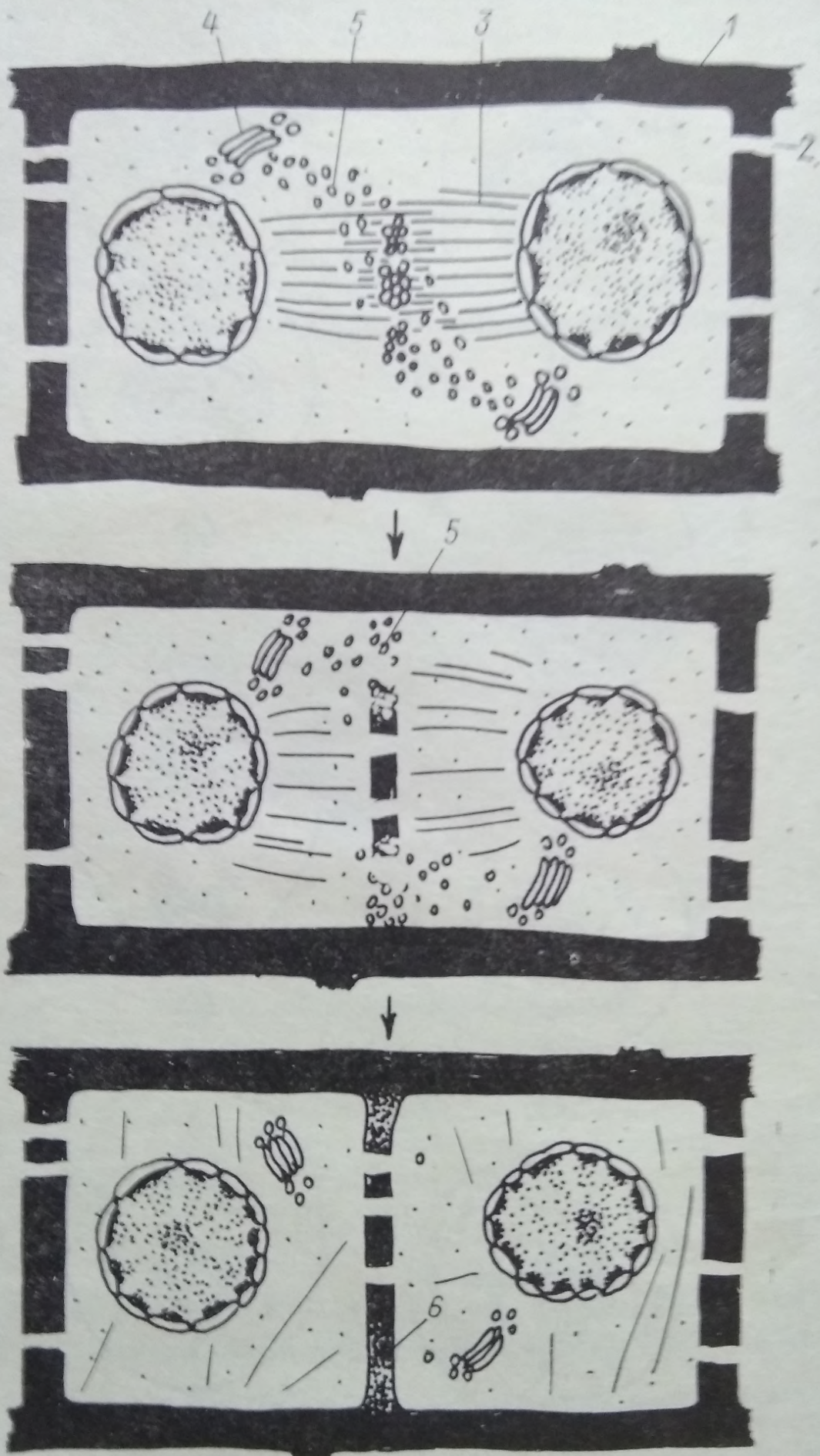


Рис. 93. Цитотомия растительной клетки.

1 — клеточная стенка; 2 — плазмодесма; 3 — остаток веретена; 4 — аппарат Гольджи; 5 — пузырьки, формирующие фрагмопласт; 6 — новообразованная клеточная стенка.



Для осуществления этих процессов в клетке формируется митотический аппарат, в состав которого входят центросомы, центральное веретено и кинетохорные участки хромосом. У животных организмов к митотическому аппарату также можно отнести и субмембранную систему сократимых фибрилл, расположенных в экваториальной области материнской клетки и обеспечивающих цитотомии (у высших растений этот процесс осуществляется с помощью фрагмопласта — структуры, образующейся в результате слияния пузырьков — производных аппарата Гольджи, рис. 93).

Центросомы представляют собой совокупность центриолей и окружающих их специфических структур, локализованных в определенной области гиалоплазмы — клеточном центре. Имеющиеся сравнительно-цитологические и экспериментальные данные указывают на то, что центриоли являются не основными, а вторично приобретенными структурами клеточных центров. Так, их нет у высших растений, ряда низших растений и некоторых простейших. Кроме того, повреждение или разрушение центриолей ультрафиолетовым или лазерным лучом в некоторых случаях не мешает нормальному митотическому делению метазойных клеток. Клетки многоклеточных животных имеют две центриоли (материнскую и дочернюю), располагающиеся в интерфазе перпендикулярно друг другу.

Центриоли по своей организации в принципе аналогичны базальным тельцам ресничек и жгутиков (см. рис. 15); это цилиндрические структуры, стенку которых формируют девять триплетов микротрубочек (рис. 94), соединенных между собой различными связками. Внутренняя микротрубочка триплета (А) состоит из 13 тубулиновых протофиламентов, две другие (В и С) — из 15. Внутри центриольного цилиндра располагаются особые структуры (аморфная «втулка» с выростами, отходящими к триплетам или «ось со спицами»). Снаружи центриоли окружены ободком аморфного матрикса. На дистальном конце материнской центриоли у триплетов имеются придатки — конические выросты из аморфного материала. Центриоли многих клеток имеют перичентриольные сателлиты. Эта структура, состоящая из головки и ножки, крепится к стенке центриольного цилиндра. Ножка сателлита часто обладает поперечной исчерченностью. Данные по ультраструктуре центриолей получены на относительно небольшом числе объектов. Детали строения центриолей могут варьировать как у представителей разных таксонов, так и у близких видов. Наибольшая универсальность характерна для организации центриольного цилиндра, однако и здесь встречаются отклонения от канонической структуры. Так, в половых клетках ряда беспозвоночных обнаружены центриоли, состоящие из 12—14 триплетов микротрубочек, а также содержащие либо одиночные микротрубочки, либо разное количе-



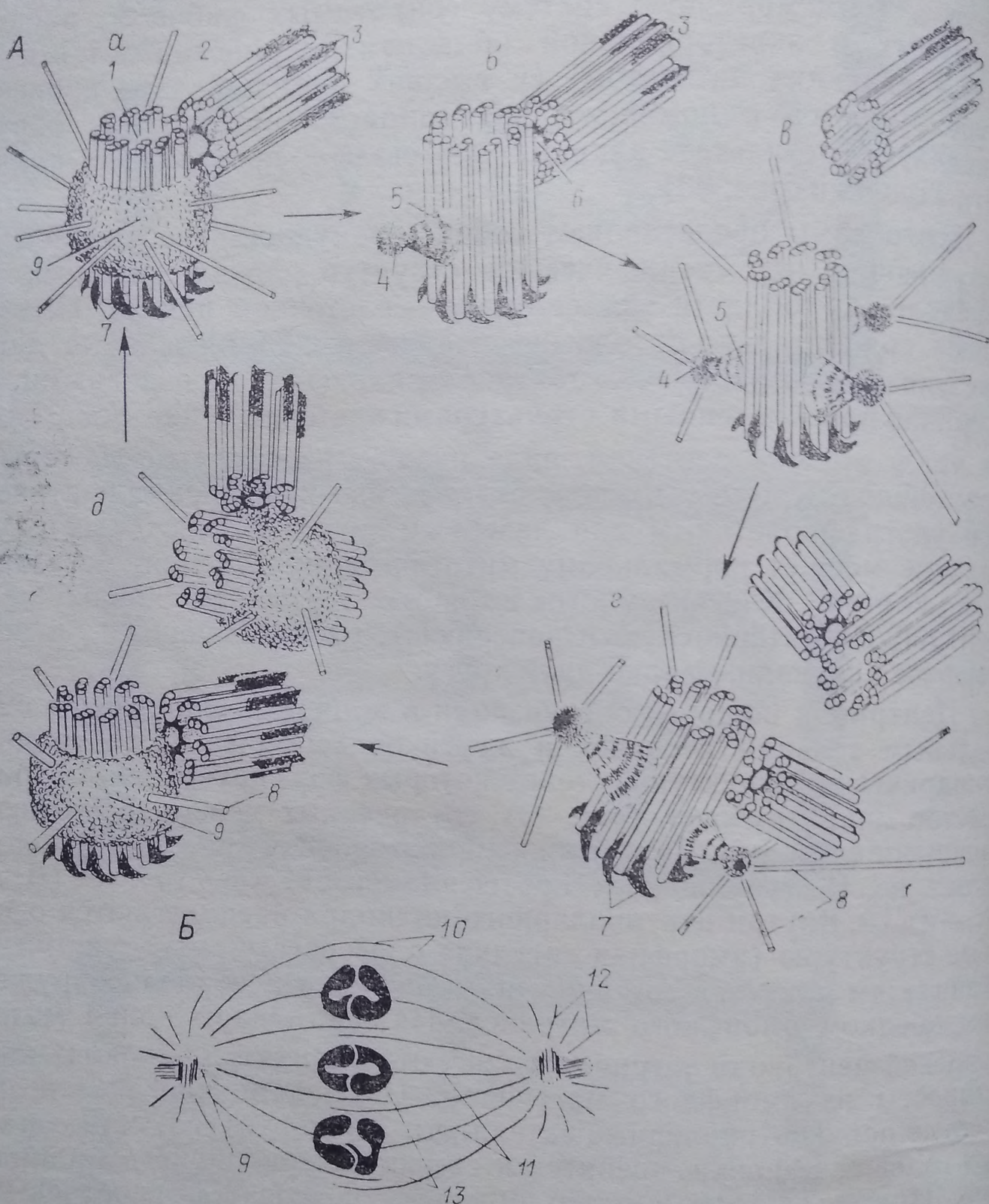


Рис. 94. Организация центриольного аппарата в клеточном цикле (А — по: Воробьев и Ченцов, 1980) и митотического аппарата в процессе анафазного расхождения хромосом в животной клетке (Б).

*а* — анафаза, *б* — начало G<sub>1</sub>, *в* — G<sub>1</sub>, *г* — S, *д* — G<sub>2</sub> и профаза. 1 — материнская и 2 — дочерняя центриоли; 3 — выросты на триплетах микротрубочек; 4 — головка и 5 — ножничные микротрубочки; 6 — ось со спицами; 7 — придатки; 8 — цитоплазматическое фибриллярное гало; 9 — фибриллярное гало; 10–12 — микротрубочки веретена (10 — полюсные, 11 — кинетохорные, 12 — нити сияния); 13 — хромосомы.



ство дуплетов (вплоть до 60—80 в гигантских центриолях Sciaga — ратного комарика).

Структура центриолей и общая организация клеточного центра меняются в течение клеточного цикла (рис. 94, А). В митозе материнская центриоль со всех сторон окружена митотическим гало (аморфным или тонкофибриллярным материалом), которое является центром схождения микротрубочек веретена. В районе проксимального конца материнской центриоли расположена дочерняя центриоль. На дистальном конце материнской центриоли (удаленном от дочерней) в просвете находится аморфная втулка. На поверхности центриольного цилиндра располагаются девять придатков. Дочерняя центриоль лишена придатков, она имеет лишь выросты на триплетах микротрубочек; на ее проксимальном конце (этим концом она обращена к материнской) в просвете центриольного цилиндра находится «ось со спицами».

При переходе клеток к интерфазе митотическое фибриллярное гало исчезает (вокруг обеих центриолей остается тонкий ободок электронно-плотного материала — матрикса). Материнская и дочерняя центриоли теряют взаимноперпендикулярную ориентацию и расходятся на небольшое расстояние. В начале  $G_1$  на материнской центриоли образуются перицентриольные сателлиты, к которым подходят цитоплазматические микротрубочки. У дочерней центриоли исчезает «ось со спицами», существовавшая во время митоза и в начале интерфазы, и появляется «втулка», характерная для «зрелой» центриоли. В периоде S центриоли реплицируются, причем структура процентиоли резко отличается от структуры «взрослой» центриоли. В периоде  $G_2$  исчезают перицентриольные сателлиты и вокруг двух материнских центриолей начинает формироваться фибриллярное гало.

Итак, в течение клеточного цикла центриоли связываются с микротрубочками посредством двух структур: перицентриольных сателлитов в интерфазе и фибриллярного гало в митозе; они индуцируют полимеризацию микротрубочек и являются, следовательно, микротрубочкоорганизующими центрами.

Другой компонент митотического аппарата — митотическое веретено (рис. 94, Б) — состоит из микротрубочек следующих разновидностей: полюсных, кинетохорных и астральных (или нитей сияния). Полюсные микротрубочки прикрепляются к центросомам, их свободные концы перекрываются в экваториальной области веретена, образуя как бы полуверетена. Кинетохорные микротрубочки, как и следует из их названия, прикрепляются к кинетохорам хромосом. Часть микротрубочек связана и с центросомой, и с кинетохором. Имеются и свободные микротрубочки с двумя незакрепленными концами. Астральные микротрубочки, или нити сияния, расходятся радиально от клеточных центров по направлению к плазматической мембране.



Минус-концы микротрубочек полуверетена обращены к центросомам, а «+»-концы — в сторону метафазной пластинки. Плюс-конец кинетохорных микротрубочек закреплен на кинетохоре. Микротрубочки веретена различаются динамическими свойствами: наиболее стабильны кинетохорные микротрубочки.

По завершении митоза веретено разбирается и восстанавливается цитоплазматическая сеть микротрубочек.

Помимо сложной и гетерогенной системы микротрубочек, слагающих основную часть видимых структур митотического аппарата, в его составе обнаружены микрофибриллы. Часть из них — актиновой природы, что было продемонстрировано в опытах с использованием тяжелого меромиозина и флуоресцирующих антител. (Сильно развитая система актиновых и миозиновых фибрилл, ориентированных перпендикулярно длинной оси клеток, выявлена в субмембранном аппарате клеток животных на поздних стадиях митотического деления. Эта система играет основную роль в процессах цитотомии.)

Еще один важный компонент митотического аппарата — кинетохорные участки хромосом.

Размеры и структура кинетохоров широко варьируют. У большинства позвоночных кинетохор представляет собой трехслойный диск диаметром 0,2—2,0 мкм, формирующийся в области центромерного участка хромосом. У некоторых насекомых и растений хромосомы не имеют первичной перетяжки; их кинетохоры состоят из тонкого слоя фибриллярного материала, распределенного вдоль хромосомы на значительном протяжении. Кинетохоры ряда других насекомых и растений представлены сферическими структурами из фибриллярного материала диаметром 0,25—0,50 мкм, расположенными в области первичной перетяжки хромосом. (Данные об организации кинетохоров будут приведены ниже.)

Одна из основных загадок митотического аппарата — природа кинетических процессов в митозе. Как говорилось выше, к важнейшим кинетическим процессам митоза относятся прометафазное перемещение хромосом в область экватора веретена с формированием метафазной пластинки и анафазное расхождение дочерних хромосом, которое обеспечивается сперва перемещением самих хромосом (анафаза А), а затем и расхождением полюсов веретена (с удлинением микротрубочек) при продолжающемся движении хромосом (анафаза Б).

До недавних пор широко обсуждалась возможная роль в этих процессах актин-миозиновой и тубулин-динеиновой механохимических систем. Однако тщательно выполненные и исключающие артефакты иммунохимические исследования позволили прийти к заключению, что представления о ведущей роли актин-миозиновой системы в перемещении хромосом не обоснованы, хотя для процессов цитотомии эта система действительно имеет основополагающее значение. Что касается тубулин-дине-



иновой системы, то представления о ее роли в кинетических процессах митоза развивались следующим образом. Еще в конце 60-х — начале 70-х годов перемещение хромосом объясняли различными взаимодействиями микротрубочек. Согласно одной из таких гипотез анафазное расхождение хромосом обеспечивается взаимным скольжением кинетохорных микротрубочек и микротрубочек центрального веретена. После того, как было обнаружено явление сборки-разборки микротрубочек *in vitro* и выявлены микротрубочкоорганизующие центры, была предложена гипотеза динамического равновесия, по которой анафазное перемещение хромосом происходит в результате сборки в области клеточных центров микротрубочек веретена и разборки кинетохорных микротрубочек. Были и попытки объяснить расхождение хромосом комбинацией этих процессов (взаимное скольжение и сборка-разборка микротрубочек). Однако ни одна из предложенных моделей не имела прямого фактического обоснования — все они базировались на косвенных данных и носили спекулятивный характер. Основной недостаток таких моделей — попытка свести сложный многокомпонентный процесс, происходящий в целостной клетке, к работе какой-то одной механохимической системы. Еще один недостаток этих гипотез — то, что в их основу были положены данные, полученные только на метазойных клетках — узком круге объектов, удобных в методическом отношении, но почти не различающихся по характеру митотического деления. Это само по себе резко ограничивает возможность объективной оценки фундаментальных и второстепенных признаков этих процессов. К обсуждению этих вопросов мы вернемся в следующем разделе.

### 5.5. ЭВОЛЮЦИОННОЕ И СРАВНИТЕЛЬНО-ЦИТОЛОГИЧЕСКОЕ НАПРАВЛЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ

При детальном анализе резко различающихся вариантов митоза, проведенном на уровне современных методических возможностей, особенно наглядно выступает сложный комплексный характер процессов митотического деления. В связи с этим представляется весьма перспективным привлечение к разработке рассматриваемой проблемы сравнительного метода исследований.

В течение последних 10—15 лет накоплен большой фактический материал по митотическому делению у низших и высших эукариот, позволивший сделать некоторые обобщения.

**Применение сравнительного метода по принципу гомологии.** Когда речь идет об одноклеточных эукариотных организмах, сравнительно-цитологические исследования процессов митоза могут преследовать различные цели. Протозоологи, альгологи,



микологи прежде всего стремятся дать характеристику специфических особенностей исследуемых ими клеток простейших, водорослей и грибов. При этом делаются попытки использовать наблюдаемые между близкими таксонами различия или сходства в процессах митотического деления в качестве важных систематических признаков для установления степени родства исследуемых форм. Такого рода задачи сравнительно-цитологических исследований не имеют непосредственного отношения к общецитологической проблеме.

Большой интерес в этом плане имеют сопоставления, преследующие цель проследить эволюцию митоза в пределах крупных таксонов, как например, представления И. Б. Райкова об эволюции митоза у простейших (рис. 95). Он (и ряд других авторов) считает, что наиболее примитивным типом митоза у современных простейших является закрытый внутриядерный плевромитоз. Микротрубочковые полуверетена в этом случае формируются внутри ядра и содержат небольшое количество микротрубочек. При этом обычно слабо развит аппарат кинетохорных микротрубочек (по одной на хроматиду). Их длина мало меняется в ходе митоза, и они не связаны с микротрубочками центрального веретена. Основную роль в расхождении хромосом играют здесь центры организации микротрубочек (ЦОМТ), представляющие собой своеобразные уплотнения ядерной оболочки, которые вначале сосредоточены в одном месте, а затем расходятся к полюсам за счет неравномерного роста мембран ядерной оболочки или каких-то других перестроек.

Этот тип митоза наиболее широко распространен: он встречается у представителей самых разных групп протистов (за исключением инфузорий) — споровиков, саркодовых, жгутиконосцев и т. д. — и у некоторых грибов. Из различных модификаций этого типа митоза через различные переходные формы И. Б. Райков выводит типы митоза, свойственные некоторым протистам и метазойным клеткам, в частности, наиболее распространенный открытый ортомитоз. Он характеризуется полной разборкой ядерной оболочки, локализацией микротрубочкообразующих центров и центрального веретена в цитоплазме и хорошо развитой системой кинетохорных микротрубочек. Общей тенденцией в эволюции митоза у эукариотных клеток по Райкову является, следовательно, утрата примитивного мембранного механизма равнонаследственного распределения хромосом и аппарата.

Несмотря на ряд достоинств предложенной Райковым схемы (логичность и соответствие имеющемуся фактическому материалу), она тем не менее не свободна от противоречий и неясностей даже в отношении простейших. Прежде всего родственные связи в пределах царства протистов установлены далеко не полностью, что создает большие сложности для оценки филогене-



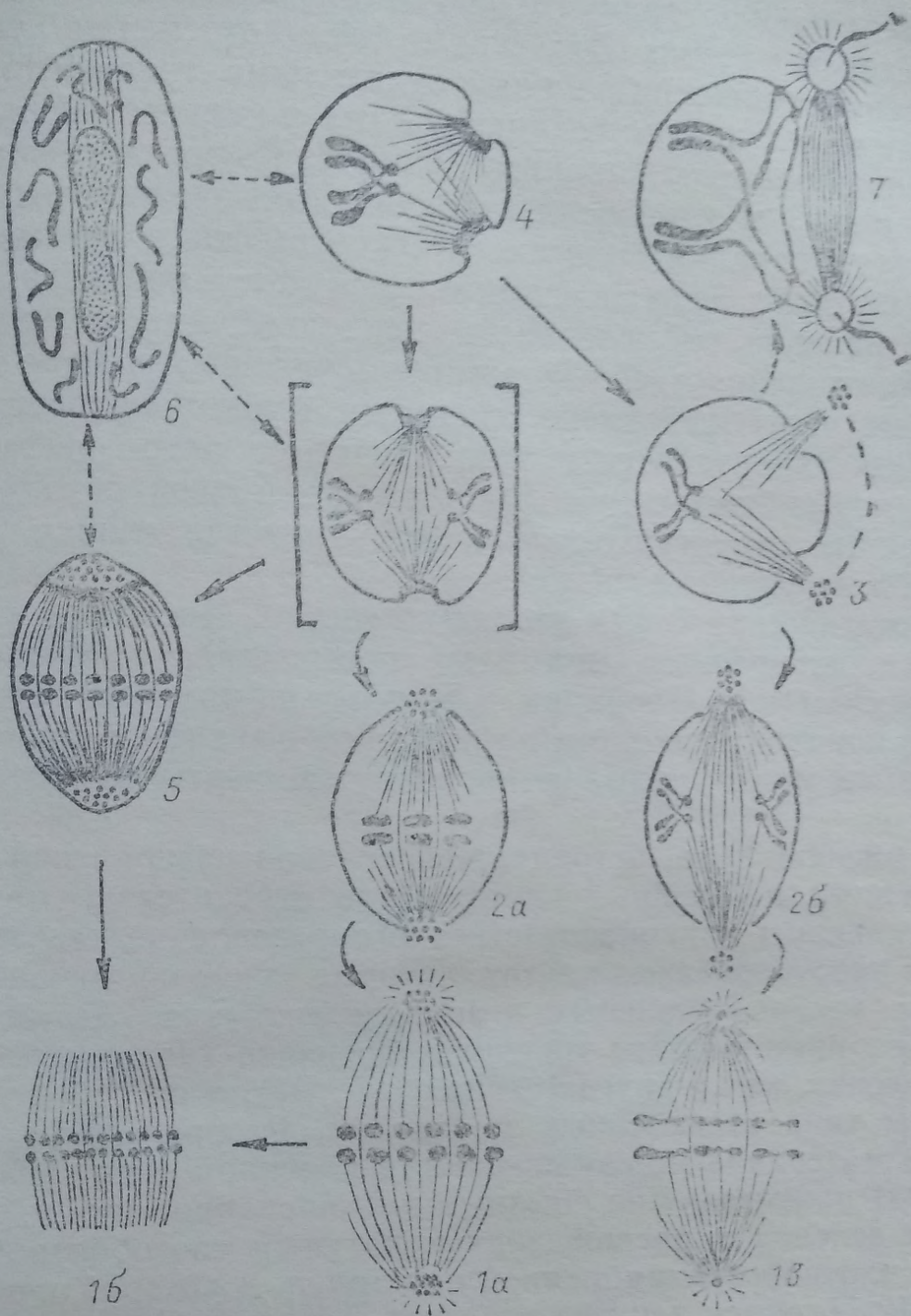


Рис. 95. Эволюция митоза у простейших (по: Райков, 1978).

1a—1b — варианты открытых митозов; 2a, 2б — варианты полужакрытых митозов; 3 — полужакрытый плевромитоз; 4 — закрытый внутриядерный плевромитоз; 5 — закрытый внутриядерный ортомитоз; 6 — закрытый эвгленоидный митоз; 7 — закрытый внеядерный плевромитоз.

тического значения вариантов митоза. Кроме того, при наличии общих тенденций к усложнению митоза и становлению открытого ортомитоза эти процессы могут протекать параллельно и независимо в филогенетически отдаленных группах протистов. Наконец, учитывая сложный комплексный характер процесса митотического деления, естественно ожидать, что в ряде случаев будут использованы варианты митоза с комбинаторикой отдельных элементарных механизмов.



Более глубокие сравнительно-цитологические сопоставления приводятся в работах Дж. Хита. Автор стремится проследить родственные отношения между отдельными таксонами низших эукариот и, обсуждая эти вопросы, не может не коснуться общих тенденций эволюционных изменений митотического процесса — процесса универсального для всех эукариотных клеток. Более того, оценивая филогенетическое значение отдельных признаков митотического деления, он вынужден признать широкое распространение параллельного, конвергентного развития этих признаков у неродственных организмов, давно разошедшихся в эволюции, что обусловлено сходными функциональными задачами. Для характеристики этих признаков автор оперирует не только морфологическими данными, но и всей совокупностью современных структурно-химических представлений о функциональной морфологии митоза.

Гипотетическая схема эволюции митоза Дж. Хита (рис. 96) является прекрасным примером построений, основанных на классическом использовании сравнительно-цитологического метода по принципу гомологий с попыткой выявить у современных организмов примитивные и продвинутые черты в организации митоза.

По мнению Хита, исторической основой становления митоза современных метазойных клеток были относительно примитивные механизмы равнонаследственного разделения геномов первичных проэукариотных клеток, которые затем претерпевали несколько последовательных этапов усложнения. За исходную форму он принимает не типичную бактерию (например, кишечную палочку, как в других схемах, рис. 97), а своеобразные организмы типа современных микоплазм. Распределение генетического материала между дочерними клетками этих организмов (рис. 98) происходит не обычным для прокариот путем, а с помощью деления и расхождения к полюсам своеобразной электронно-плотной субмембранной пластинки, к которой прикреплен ДНК. Имеются также косвенные свидетельства о наличии у этих клеток актиноподобных белков или, скорее, их аналогов, способных образовывать фибриллярные структуры в цитоплазме. На основании всех этих данных делается вывод, что первым этапом в эволюции митоза было обособление ядерного аппарата вместе со структурами, обеспечивающими равнонаследственное распределение геномов (типа субмембранной пластинки микоплазмы). Это могло произойти путем впячивания плазматической мембраны (рис. 96, А). Затем возникла необходимость в усовершенствовании аппарата, обеспечивающего распределение геномов при делении, что привело к появлению внутриядерного динамичного скелета из пучков фибриллярного актина. С увеличением размеров геномов этого оказалось недостаточно и актиновый скелет был заменен или дополнен аналогичным скелетом из микротрубочек, причем пластинкоподобные структуры, к



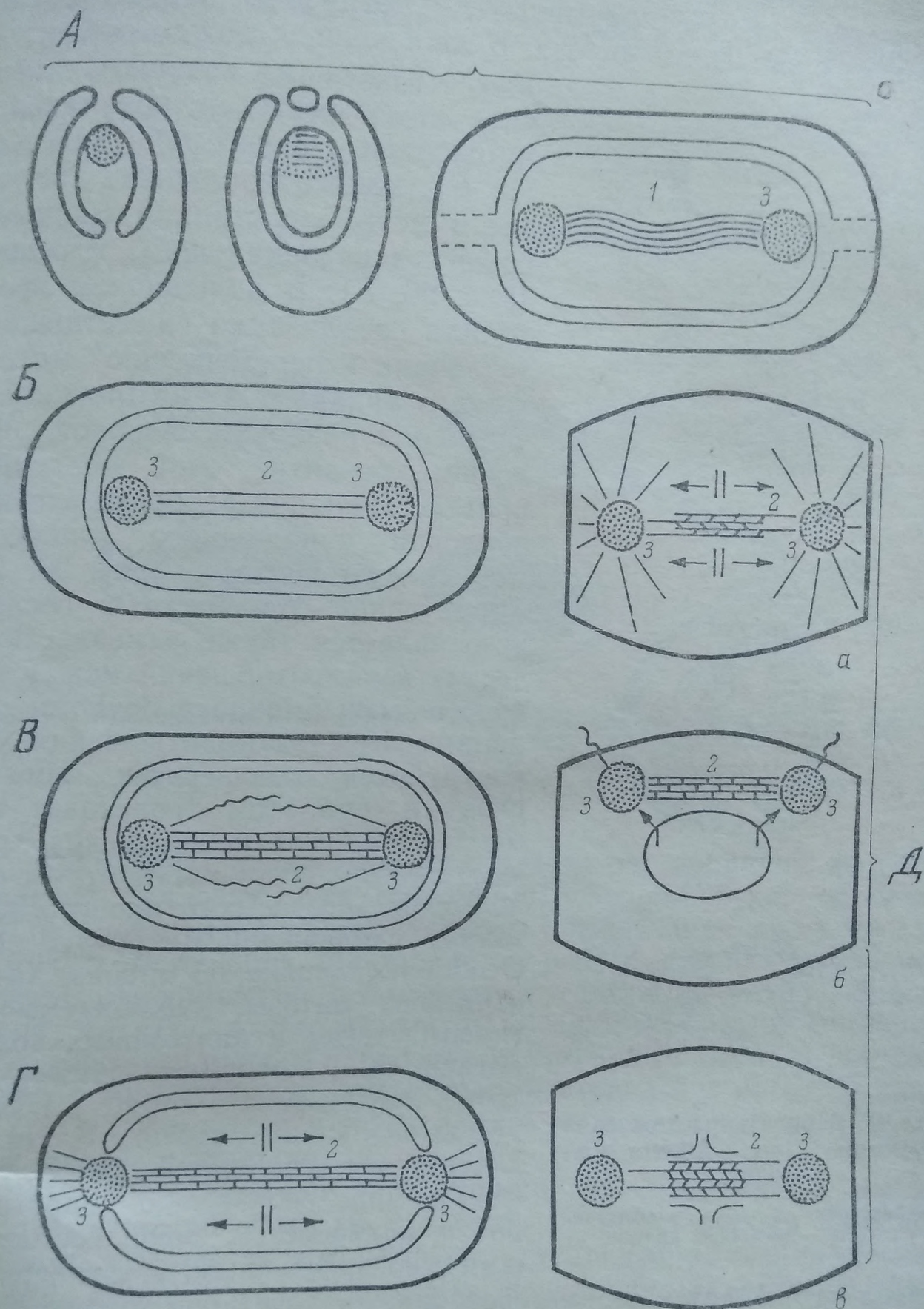


Рис. 96. Последовательные стадии эволюции митоза (по: Heath, 1980).  
 А—Д — последовательные стадии усложнения митотического аппарата 1 — примитивный актиновый цитоскелет; 2 — микротрубочковый цитоскелет; 3 — центры образования структур цитоскелета. а—в — митоз в метазойных клетках (а), у гипермастигид (б) и диатомовых водорослей (в).



которым прикреплялись дочерние хромосомы, стали и центрами организации микротрубочек (рис. 96, Б). Образованием тубулинового скелета из непрерывных микротрубочек завершился второй этап в эволюции митоза. В дальнейшем между скелетными

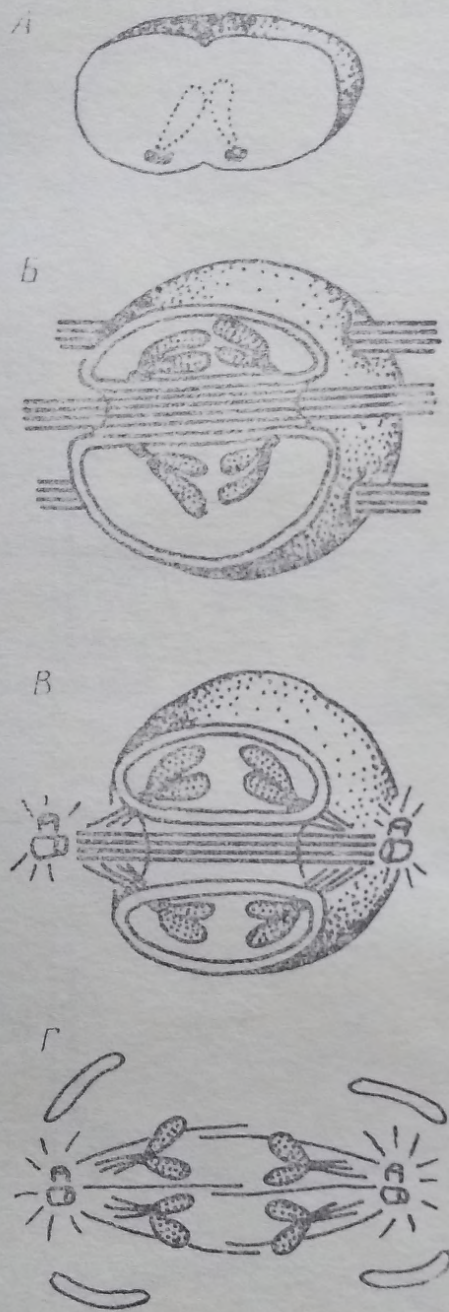


Рис. 97. Варианты расхождения хромосом (по: Alberts e. a., 1989).

А — бактерии; Б, В — динофлагелляты; Г — животные клетки.

микротрубочками возникли статические взаимодействия; появились кинетохорные микротрубочки (рис. 96, В); конденсированные хромосомы в метафазе стали располагаться в экваториальной плоскости (рис. 96, Г). В дальнейшем происходила реализация наметившейся тенденции к перемещению митотического аппарата в цитоплазму и частичной разборке ядерной оболочки; развитие этой тенденции привело к полной разборке ядерной оболочки и появлению типичного метазойного митоза (рис. 96, Д). Характерной особенностью последнего является также замена статических взаимоотношений между непрерывными микротрубочками на динамичные взаимоотношения микротрубочек полуверетен. Иными словами, при этом происходит замена механизма перемещения хромосом путем сборки микротрубочек на менее энергоемкий процесс взаимного скольжения микротрубочек. Особое положение, по мнению Хита, занимают митозы, наблюдаемые у гипермастигид и диатомовых водорослей. Они, как и метазойные митозы, представляют собой высшие этапы эволюции митоза. Клеткам диатомовых водорослей свойственно взаимное скольжение микротрубочек полуверетен, присущее высшим многоклеточным, а у гиперма-

стигид наблюдается весьма своеобразное сочетание хорошо развитого цитоплазматического аппарата со сложными механизмами внутриядерного расхождения дочерних хромосом (см. ниже). Большим достоинством приведенных обобщений является то, что они основываются на отношениях, наблюдаемых не у одной какой-либо группы низших эукариот, а у всей совокупности этих организмов. Весьма прогрессивной выглядит и попытка положить в основу становления митоза не специализи-



рованный мембранный механизм расхождения хромосом у современных бактерий, а, по-видимому, более примитивный цитоплазматический механизм распределения геномов, характерный для микоплазм.

Классическое применение сравнительного метода для построения гипотетических схем эволюции митоза является неособенно популярной гипотезой, объясняющей эти механизмы, поскольку базируется на понимании их исторической обусловленности, т. е. того, на какой основе и как возникли эти механизмы.

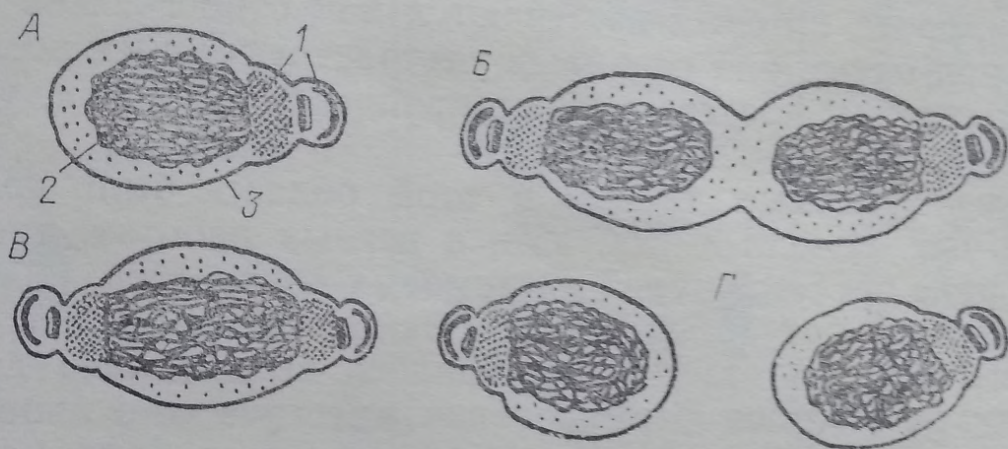


Рис. 98. Последовательные стадии (А—Г) деления микоплазмы (по: Maniloff, Morowitz, 1967).

1 — субмембранная пластинка, к которой крепится ДНК (2); 3 — плазматическая мембрана.

**Применение сравнительного метода по принципу функциональной аналогии.** Для современных низших эукариот характерна значительная вариабельность организации процессов митотического деления. Например, на разных стадиях жизненного цикла миксомицетов представлены два резко различающихся типа митоза — открытый митоз с центриольным аппаратом (стадия миксамебы) и полузакрытый, внутриядерный митоз с клеточными центрами, лишенными центриолей и расположенными на полюсах ядра в участках, где разобрана ядерная оболочка (стадия плазмодия).

Подобные примеры пластичности процессов митоза или отдельных его механизмов у низших эукариот весьма многочисленны, что заставляет авторов, применяющих сравнительный метод по принципу гомологии, переходить к стихийному использованию сравнения по принципу функциональной аналогии, т. е. искать функциональное объяснение независимого появления сходных признаков у представителей разных таксонов или, наоборот, резких различий у представителей близкородственных групп. Логичным продолжением таких сопоставлений будет целенаправленное использование для разработки общих проблем митоза объектов, у которых максимально выражены те



или иные признаки. Иными словами, речь уже идет об использовании сравнительного метода по принципу функциональной аналогии не для филогенетических построений, а как непосредственного и самостоятельного общецитологического рабочего метода.

При таком подходе к вопросу и, в частности, к проблеме механизмов перемещения хромосом, как следует из рассмотренной схемы Хита, большой интерес представляют гипермастигиды и особенно диатомовые водоросли. Последние вполне удовлетворяют всем перечисленным выше требованиям. Они составляют большую и сильно дивергировавшую группу одноклеточных организмов, среди которых встречаются как относительно мелкие формы, пригодные для серийных ультраструктурных исследований, так и виды, представленные крупными клетками, удобными для прижизненных наблюдений.

Весьма значимые данные в этой области были получены группой Дж. Пиккет-Хипса. Уже в первых работах, проведенных на ряде представителей диатомовых водорослей, полностью подтвердились результаты классических исследований конца прошлого века. В дальнейшем удалось выявить ряд деталей, касающихся способов формирования митотического аппарата и его взаимодействия с хромосомами в митозе (рис. 99). Так, микротрубочкоорганизующий центр, представляющий собой овальную электронно-плотную структуру, преобразуется в профазе в две пластинки с прилегающими к ним снаружи вакуолярными структурами (рис. 99, А, Б). На внутренних (обращенных друг к другу) сторонах пластинок начинается формирование двух полуверетен из микротрубочек с противоположной полярностью. У некоторых видов диатомовых в основании каждой формирующейся микротрубочки лежит электронно-плотное тельце.

Вначале микротрубочки полуверетен перекрываются таким образом, что дистальные концы формирующихся микротрубочек доходят до противоположных полюсов (рис. 99, В). В дальнейшем, по мере удлинения микротрубочек и расхождения в противоположных направлениях пластинок митотического аппарата, микротрубочки полуверетен перекрываются лишь в центральной части веретена, однако, довольно значительной по объему (рис. 99, Г). В это время заканчивается профаза митотического деления и временно приостанавливаются кинетические процессы (дальнейшее удлинение веретена и расхождение пластинок); завершаются также процессы спирализации и конденсации хромосом, разбирается ядерная оболочка, появляются отчетливо выраженные кинетохорные участки хромосом и связанные с ними микротрубочки (рис. 99, Д).

Данные о динамике формирования кинетохорных микротрубочек, полученные на разных видах диатомовых и некоторых других водорослей, позволили прийти к выводу, что их образо-



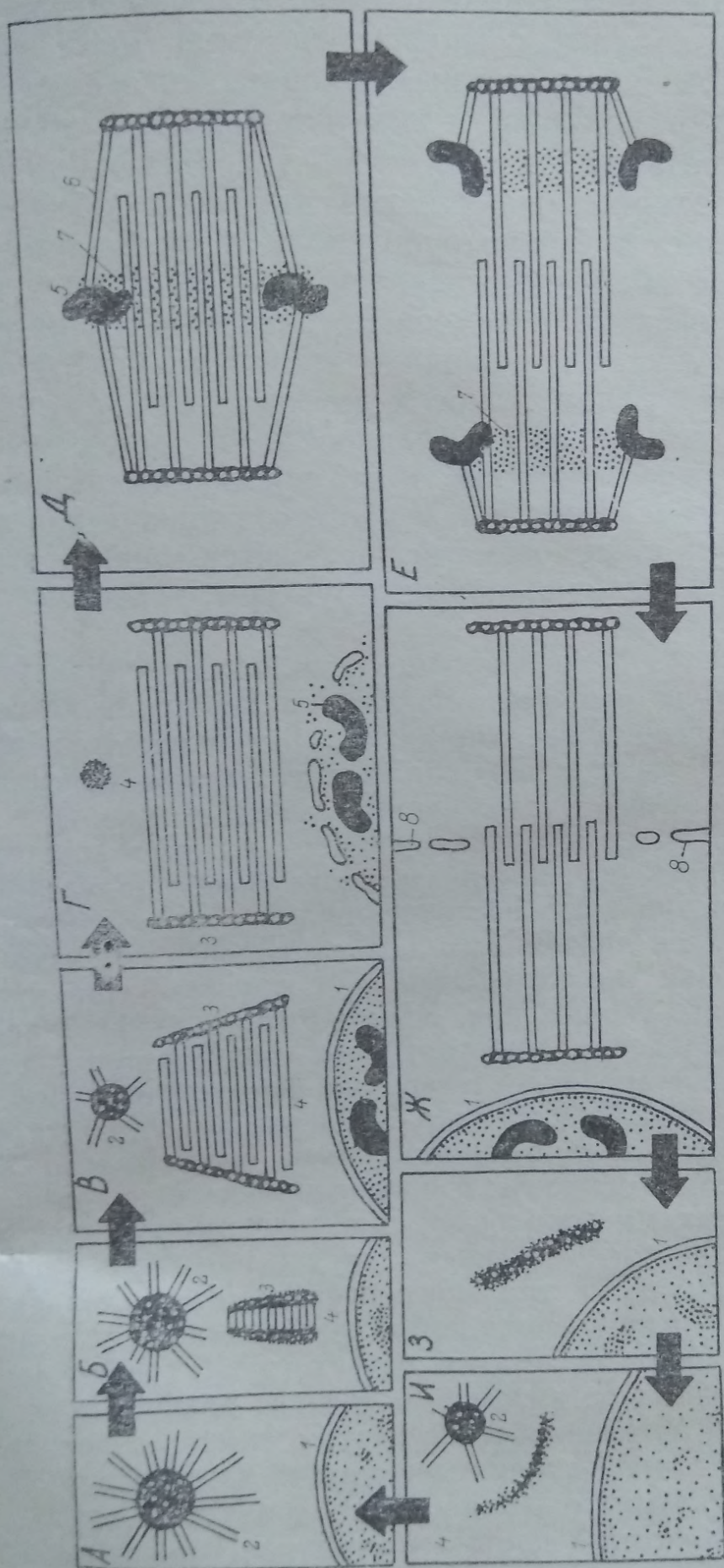


Рис. 99. Последовательные стадии митоза (А—И) у диатомовых водорослей.

1 — ядерная оболочка; 2 — микротрубочкоорганизующий центр; 3 — микротрубочкоорганизующие пластинки полуверетен; 4 — микротрубочки; 5 — хромосомы; 6 — кинетохорные микротрубочки; 7 — воротничок; 8 — формирующаяся перегородка между дочерними клетками.



вание начинается не от кинетохорных участков хромосом, а от пластинок микротрубочкоорганизирующих центров.

Таким образом, кинетохорные микротрубочки представляют собой структуры, сходные с микротрубочками полуверетен, но не вошедшие в их состав. Этот вывод хорошо согласуется с данными об одинаковой полярности кинетохорных микротрубочек и микротрубочек соответствующих им полуверетен митотического аппарата. Кинетохорные же участки хромосом обеспечивают прежде всего контакт микротрубочек с хромосомами. После разборки ядерной оболочки у диатомовых происходят весьма сложные прометафазные перемещения материнских хромосом. Создается впечатление, что вначале хромосомы пытаются переместиться либо к одному, либо к другому полюсу клетки, но в конце концов устанавливается равновесие и хромосомы занимают экваториальное положение. В это время у некоторых диатомовых в области веретена или в месте соединения кинетохорных микротрубочек с хромосомами образуются мощно развитые электронно-плотные фибриллярные структуры, так называемый воротничок (рис. 99, Д).

С этого момента, представляющего собой своеобразную метафазу, начинаются процессы анафазного перемещения дочерних хромосом. Материнские хромосомы раздваиваются, делятся на две равные части и волокнистые структуры воротничка. Возобновляется процесс расхождения пластинок митотического аппарата, что приводит к удлинению центрального веретена и сокращению области перекрытия микротрубочек полуверетена. Как показали специальные исследования, в основе этих изменений у одних видов диатомовых лежат сложные процессы неравномерной сборки микротрубочек, а у других — еще и процессы их взаимного скольжения. Кроме того, в анафазе происходит перераспределение микротрубочек полуверетена, ранее расположенных равномерно, — теперь они формируют пучки, состоящие из тесно сближенных микротрубочек, разделенных прослойками гиалоплазмы с фибриллярными структурами. Расхождение хромосом к полюсам сопровождается также укорочением кинетохорных микротрубочек и активным перемещением фибриллярных электронно-плотных структур воротничка к противоположным концам центрального веретена (рис. 99, Е).

Авторы рассмотренной серии работ сопоставили свои результаты с данными, полученными на других группах одноклеточных и многоклеточных организмов, исходя из предположения о том, что, несмотря на разнообразие картин митотического деления в основе кинетических процессов митоза (в частности, прометафазного и анафазного перемещения хромосом) лежат общие для всех эукариотных клеток механизмы. Иными словами, эти исследователи перешли к прямому использованию сравнительного метода по принципу морфофункциональной аналогии. Оказалось, что свойственные диатомовым механизмы форми-



рования полуверетен и полярных митотических микротрубочко-организующих центров характерны также для митозов низших грибов и высших многоклеточных. Более того, из этих сопоставлений получается, что кинетохорные микротрубочки и в других типах митозов имеют общее с микротрубочками полуверетен происхождения, так как начинают образовываться в полярных центрах организации микротрубочек, и лишь позднее вступают в связь с кинетохорными участками хромосом.

Второй важный общий принцип, вытекающий из анализа диатомовых митозов, касается механизмов прометафазного и анафазного движения хромосом. Перемещение материнских хромосом в прометафазе то к одному, то к другому полюсу обусловлено, по мнению авторов, воздействиями кинетохорных участков противоположной направленности. Активную роль в этих перемещениях авторы приписывают кинетохорным участкам, в которых, по их мнению, локализована динеиноподобная АТФаза. Поскольку же на материнской хромосоме имеется два кинетохорных участка, взаимодействующих с микротрубочками противоположной полярности, то в конце концов устанавливается равновесие, и материнские хромосомы располагаются в экваториальной плоскости. При этом, по мнению авторов, энергия макроэргов, полученная из АТФ при активации динеиноподобной АТФазы кинетохорных участков хромосом, аккумулируется в натяжении волокнистых структур типа воротничка в области крепления микротрубочек к кинетохорным участкам. После деления материнской хромосомы именно эта энергия и используется для анафазного перемещения хромосом к полюсам клетки. Кинетохорные же микротрубочки лишь направляют такое перемещение, а его скорость регулируется скоростью разборки микротрубочек, осуществляемой под влиянием кинетохорных участков дочерних хромосом. Вспомогательную, но не главную роль в анафазном расхождении дочерних хромосом может играть и расхождение полюсов с дочерними микротрубочкоорганизующими центрами, которое осуществляется путем удлинения центрального веретена, в результате либо скольжения, либо неравномерного роста микротрубочек полуверетен.

Разработанную на примере диатомовых водорослей модель прометафазного и анафазного перемещений хромосом в митозе авторы распространяют и на обычный метазойный митоз. Большим достоинством этой модели является отход от традиционных представлений о ведущей роли микротрубочковых систем в механизмах перемещения хромосом. В предлагаемой модели сделана попытка рассмотреть эти процессы как результат сложного взаимодействия кинетохорных участков хромосом, микротрубочек, волокнистых структур митотического аппарата и других компонентов целостной клетки. При этом авторы неоднократно подчеркивают, что одним из необходимых условий для создания модели кинетических процессов в митозе должно быть



ее соответствие всем наблюдаемым в живой природе модификациям этих процессов.

В последнее время и на метазойных клетках получен ряд данных, которые привели к пересмотру взглядов на кинетохор, как пассивную структуру, обеспечивающую лишь прикрепление микротрубочек к хромосомам. Так, инактивация одного из кинетохоров в прометафазе ультрафиолетовым или лазерным облучением вызывает смещение хромосомы к противоположному полюсу; по-видимому, в это время хромосома находится под воздействием сил натяжения со стороны обоих полюсов. Весьма ценная информация получена путем микроинъекции в живые клетки меченного биотином тубулина, локализацию которого можно определить иммунохимическим методом с помощью антител, конъюгированных с коллоидным золотом. Такие опыты показали, что в метафазе меченый тубулин включается в полюсные микротрубочки на их свободном «+»-конце в центральной части веретена (что вполне естественно) и (что весьма неожиданно) в кинетохорные микротрубочки в области кинетохора, т. е. на закрепленном «+»-конце. В анафазных клетках в кинетохорных участках, напротив, происходит разборка микротрубочек; в то же время на центросомах рост микротрубочек продолжается и в анафазе. Таким образом, кинетохорные микротрубочки могут удлиняться и укорачиваться путем добавления или удаления тубулиновых субъединиц в области кинетохоров, которые, таким образом, могут индуцировать сборку или разборку микротрубочек в зависимости от фазы клеточного цикла. Эти данные вызвали новую волну интереса к кинетохорам и стимулировали, в частности, исследования, посвященные формированию кинетохорных микротрубочек.

В проведенных с помощью видеоусилительной установки наблюдениях на живых клетках тритона, обладающих крупными веретевыми, удалось проследить за поведением в прометафазе индивидуальных микротрубочек, растущих от полюсов веретена. Оказалось, что они то удлиняются, то укорачиваются, как бы «прочесывая» цитоплазму в поисках кинетохора. Как только происходит контакт микротрубочки с кинетохором, хромосома начинает двигаться к полюсу. (Интересно, что случайно прикрепившиеся к микротрубочке везикулы двигаются в том же направлении и с той же скоростью, что и хромосомы.) Сходные данные получены и на культивируемых клетках.

В настоящее время можно считать доказанным, что кинетохорные микротрубочки формируются из динамически нестабильных микротрубочек, берущих начало от центросомы и «врастающих» в кинетохор. Используя светооптические, электронно-микроскопические и иммунохимические методы, удалось показать, что в прометафазе достаточно прикрепления всего одной микротрубочки к кинетохору для того, чтобы хромосома начала двигаться к полюсу. (Следовательно, вряд ли эти перемещения



обусловлены разборкой микротрубочек, как полагали ранее.) Совокупность многочисленных данных позволяет предположить, что хромосомы двигаются к полюсам под действием «перемещающих» их по микротрубочкам (наподобие белков кля-точной подвижности — динеина, кинезина и т. д.). Удлинение и укорочение кинетохорных микротрубочек в области кинетохоров, вероятно, может регулироваться деятельностью этих моторов. Таким образом, кинетохоры — это активная структура, которая обеспечивает механохимические процессы: например, в анафазе кинетохорные участки хромосом активно «шагают» по микротрубочкам, а освобождающиеся концы побочек подвергаются деполимеризации. Полюсные микротрубочки, вероятно, представляют собой каркас для перемещения хромосом; расхождение полюсов осуществляется с помощью комбинации взаимного скольжения и полимеризации микротрубочек.

Детальные морфологические исследования, проведенные на разных объектах, а также модельные эксперименты на выделенных из диатомовых водорослей центральных веретенах (их реактивация *in vitro* путем добавления АТФазы и димеров тубулина) показали, что в области перекрывающихся микротрубочек центрального веретена действительно имеют место два явления — сборка на свободных концах микротрубочек и их взаимное скольжение. Благодаря этим двум процессам область перекрытия не увеличивается, а полюса клеток, естественно, удаляются друг от друга в противоположных направлениях.

Для подтверждения гипотезы об активном участии кинетохора в кинетических процессах митоза необходимы тщательные структурно-химические исследования кинетохорных участков хромосом. К сожалению, большинство данных о структуре кинетохора получено на клетках позвоночных. Ультраструктура кинетохора меняется в течение митоза. В профазе до прикрепления микротрубочек он выявляется в виде единой пластинки толщиной около 40—60 нм, состоящей из многочисленных тесно переплетенных фибрилл, видимо, представляющих собой ДНК. Эта пластинка отделена от центромерного хроматина светлой зоной толщиной 25—40 нм с рыхло уложенными фибриллами, по-видимому, обеспечивающими связь кинетохорной пластинки с хромосомой. В отсутствие микротрубочек с кинетохорной пластинкой ассоциируется заметная волокнистая «корона», простирающаяся на значительное расстояние. По мере формирования кинетохорных микротрубочек и закоривания их в кинетохоре внешняя кинетохорная пластинка изгибается; ее размеры уменьшаются; наблюдается и некоторая редукция «короны». К концу прометафазы кинетохоры уже прочно связаны с полюсами веретена через пучки кинетохорных микротрубочек. В метафазе кинетохор приобретает трехслойную структуру; внешний слой



толщиной около 40—60 нм, вероятно, соответствует кинетохорной пластинке, которая выявляется до прикрепления микротрубочек. Средний слой кинетохора толщиной 20—35 нм соответствует светлой зоне, отделяющей «неприкрепленный» кинетохор от хромосомы. В этом слое располагаются фибриллы, которые осуществляют структурную связь хромосомы с внешней пластинкой, несущей микротрубочки. Внутренний слой кинетохора (20—50 нм), состоящий из плотно упакованного фибриллярного материала, тесно контактирует с хроматином центромеры.

В настоящее время проводятся интенсивные биохимические исследования организации кинетохоров, стимулированные открытием аутоиммунных антител, реагирующих с кинетохорами. В разных клетках иммунохимическими методами в составе кинетохора были выявлены белки молекулярной массой от 14 до 140 кДа. Среди них есть белки, обладающие некоторым сходством с гистонами; их удаление не влияет на способность хромосом индуцировать сборку микротрубочек *in vitro*, т. е. эти белки скорее связаны с хроматином, чем с микротрубочками. Другие компоненты кинетохора обладают сродством к тубулину. У дрожжей с помощью клонирования центромерной ДНК обнаружена последовательность, отвечающая за связывание определенных кинетохорных белков. Существуют также белки (38, 135 и 155 кДа), временно ассоциирующиеся с кинетохором и получившие название внутренних центромерных белков. В материнской хромосоме они прочно связаны с белками матрикса в ее центромерной области и, по-видимому, обеспечивают правильное расположение хроматид. При расхождении последних в начале анафазы эти белки мигрируют в область экватора веретена. Некоторые исследователи приписывают им организующую роль в формировании актин-миозинового кольца при цитотомии в поздней телофазе.

В области кинетохоров как будто выявляются и белки механохимической системы — цитоплазматический динеин и кинезин. В составе веретена обнаруживаются MAP, кальций и кальцийсвязывающие белки (кальмодулин, кальпаин и др.); кальций, по-видимому, содержится в везикулах: на многих метазойных клетках показана закономерная ориентация вокруг митотического веретена мелких пузырьков, являющихся дериватами ЭПС, аппарата Гольджи и ядерной оболочки.

Таким образом, как видно из всего вышеизложенного, к настоящему времени достигнут определенный прогресс в анализе структурно-химической организации компонентов клетки, находящейся в фазе митоза, однако, несмотря на это, многие принципиально важные вопросы все еще остаются не выясненными.

Большой интерес и для понимания механизмов митоза, и для выяснения возможных вариантов организации ядерного аппарата представляет исследование современными комплексными методами различных вариантов закрытых митозов (с сохра-



нением ядерной оболочки), особенно характерных для низших грибов. Морфологическое изучение такого варианта митоза было проведено в последние годы у дрожжей.

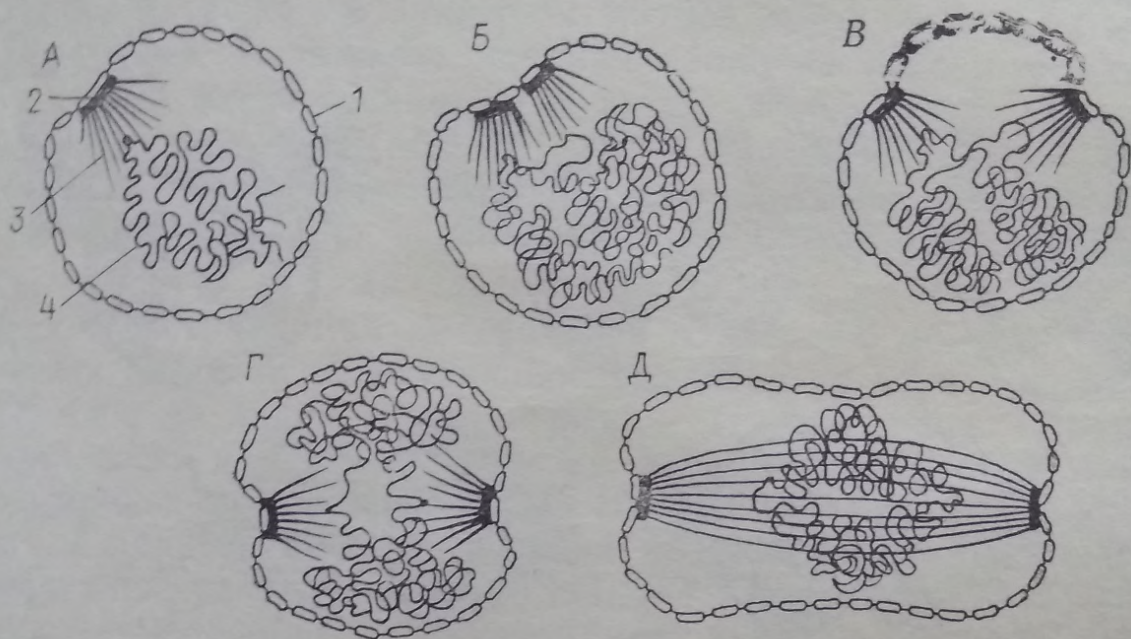


Рис. 100. Последовательные стадии (А—Д) митотического деления дрожжей. (по: Kubai, 1975).

1 — ядерная оболочка, 2 — микротрубочкоорганизующий центр, 3 — микротрубочки, 4 — хромосомы.

Митотический аппарат дрожжей формируется внутри ядра (рис. 100); при этом происходит объединение микротрубочкоорганизующих центров и структур поверхностного аппарата ядра. Микротрубочкоорганизующие центры представлены двумя пластинками, расположенными во внутренней мембране ядерной оболочки. К ним изнутри крепятся и непрерывные, и кинетохорные микротрубочки. Последние обычно небольшой длины и служат для закрепления дочерних хромосом в области кинетохорных участков. Анафазное перемещение хромосом осуществляется путем расхождения микротрубочкоорганизующих центров с прикрепленными микротрубочками обоих типов. При этом происходит значительное удлинение микротрубочек центрального веретена при сохранении постоянной длины кинетохорных микротрубочек, что и приводит к расхождению дочерних хромосом к противоположным полюсам ядра. Митотический процесс заканчивается разделением материнского ядра перетяжкой в экваториальной области и образованием двух дочерних ядер.

В анафазе у дрожжей происходят весьма сложные преобразования непрерывных микротрубочек веретена: количество их постепенно уменьшается, а длина увеличивается, так что к концу анафазы остается всего одна длинная центральная микротрубочка.



Для плодотворных сравнительных сопоставлений нужны как можно более полные данные о компонентах митотического аппарата и о разных вариантах закрытых митозов, в частности, у такой важной в систематическом и филогенетическом плане группы простейших, как жгутиконосцы.

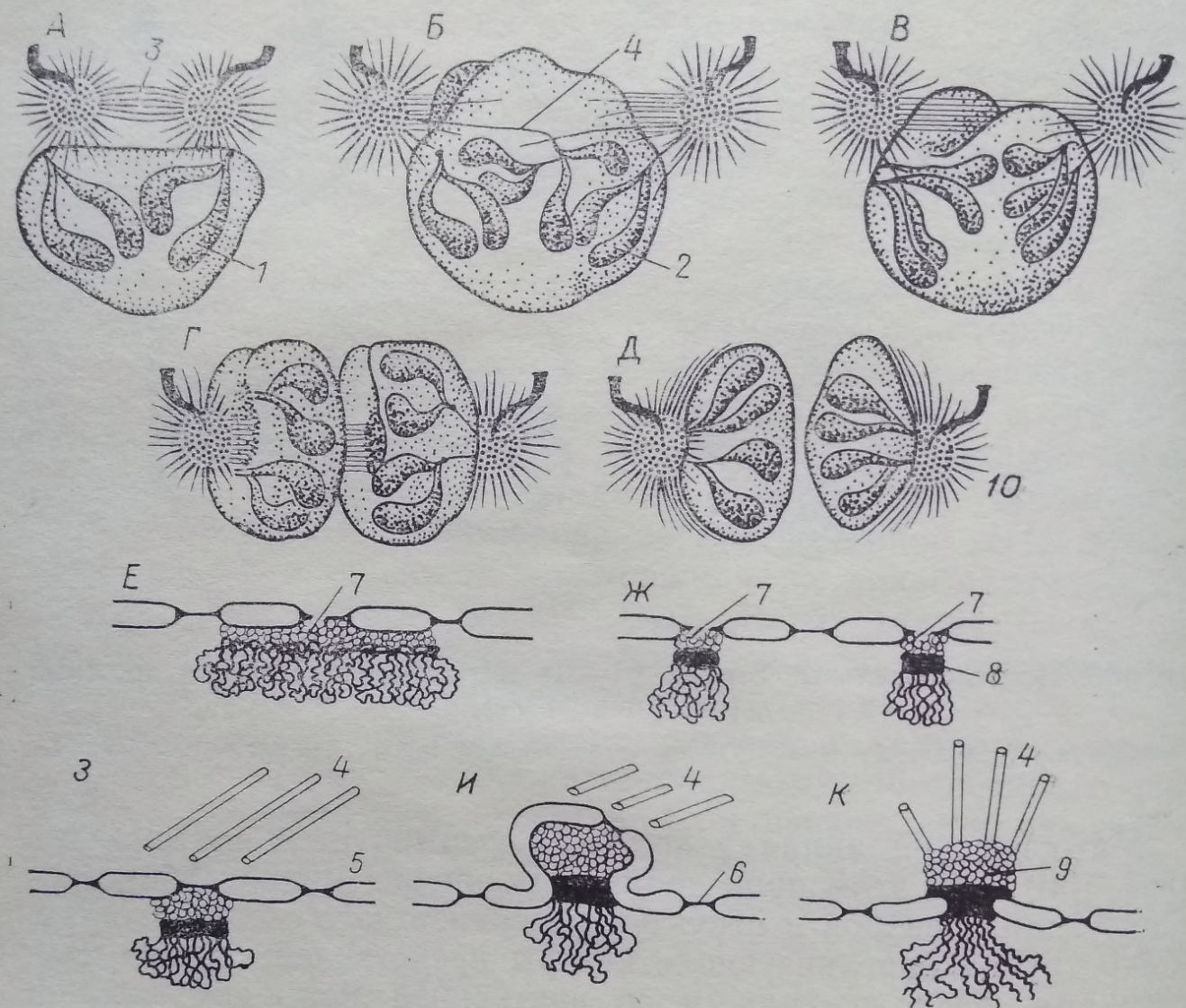


Рис. 101. Митоз у гипермастигид (по: Райков, 1978).

А—Д — последовательные фазы закрытого митоза; Е—К — изменения кинетохоров и ядерной оболочки в области крепления хромосом и микротрубочек митотического аппарата в препрофазе (Е), профазе и ранней анафазе (Ж—К). 1 — материнские и 2 — дочерние хромосомы; 3 — микротрубочки центрального веретена; 4 — кинетохорные микротрубочки; 5 — ядерная оболочка; 6 — поры в ядерной оболочке; 7 — фибриллярный слой кинетохора; 8 — плотный диск кинетохора; 9 — ЦОМТ; 10 — радиальные микротрубочки.

Специфическим признаком организации митоза у жгутиконосцев является наличие в их цитоплазме более или менее сложного митотического аппарата, представленного микротрубочкоорганизующими центрами (ЦОМТ) и гетерогенной системой микротрубочек. У одного из видов гипермастигид ЦОМТ образованы двумя лентовидными тяжами с шаровидными электронно-плотными скоплениями на концах. В профазе ЦОМТ сближаются с ядром, вокруг них возникают радиальные пучки микротрубочек, а между ними — центральное веретено (рис. 101, А). Затем хромосомы и их кинетохоры удваиваются, централь-



ное веретено растет в длину и как бы вдавливаются в ядро (рис. 101, Б). К этому моменту некоторые из радиальных микротрубочек присоединяются к кинетохорам и становятся кинетохорными микротрубочками. В дальнейшем хромосомы расходятся, а кинетохорные микротрубочки укорачиваются (рис. 101, В). Стадия метафазы в закрытом митозе этого вида практически отсутствует. В анафазе ядерная оболочка перешнуровывается, и теперь расхождение достигается за счет роста в длину центрального веретена (рис. 101, Г). В телофазе исчезает центральное веретено (благодаря деполимеризации микротрубочек), а дочерние ядра некоторое время сохраняют связь с ЦОМТ (рис. 101, Д), впоследствии отделяясь от них.

Процесс встраивания кинетохоров в ядерную оболочку, характерный для многих жгутиконосцев, детально изучен на примере одного из видов гипермастигид — *Trypanosoma*. Кинетохор, состоящий из плотного диска и фибриллярного слоя, слабо конденсирован в препрофазе (рис. 101, Е); постепенно конденсируясь, он делится на два дочерних кинетохора, расходящихся на небольшое расстояние (рис. 101, Ж). Затем каждый из кинетохоров куполообразно приподнимает ядерную оболочку так, что плотный диск кинетохора оказывается встроенным в нее (рис. 101, З, И). При переходе к анафазе куполообразно приподнятая часть ядерной оболочки распадается, и к фибриллярному слою кинетохора прикрепляются микротрубочки веретена (рис. 101, К). Тонкие механизмы расхождения кинетохоров пока не ясны.

У наиболее интересной с филогенетической точки зрения группы жгутиконосцев — представителей мезокариот динофлагеллят — организация митоза в принципе также носит двойственный характер. Здесь тоже имеется внеядерный митотический аппарат, но существенная роль в процессе расхождения дочерних хромосом принадлежит ядерной оболочке, сохраняющейся во время митоза.

Одной из особенностей митоза динофлагеллят по сравнению с митозом гипермастигид является более простая структурная организация митотического аппарата цитоплазмы и аппарата связи между ядерной оболочкой, хромосомами и кинетохорными микротрубочками. В цитоплазматическом митотическом аппарате некоторых динофлагеллят не обнаруживается морфологически выраженных структур клеточного центра (как и в клетках высших растений). У других динофлагеллят имеются типичные центриоли, хотя сателлиты в виде скоплений РНП выражены слабо. Система микротрубочек представлена непрерывными и кинетохорными микротрубочками, однако количество их относительно невелико. Микротрубочки сосредоточены во внутриядерных цитоплазматических каналах.

Формирование таких каналов является второй особенностью митоза динофлагеллят. Этих каналов в клетках динофлагеллят



разных видов может быть от одного до нескольких (рис. 102). Они располагаются по длинной оси ядра перпендикулярно к плоскости деления материнского ядра на два дочерних. Стенка каналов на всем протяжении образована мембранами ядерной оболочки с поровыми комплексами. В каналах проходят непрерывные микротрубочки, связывающие полюса клетки, и кинетохорные микротрубочки, контактирующие с поровыми комплексами. К ядерной мембране в области поровых комплексов крепятся хромосомы, не образуя морфологически четко выраженных связывающих структур, как у гипермастигид. Есть основания предполагать, что деление материнской хромосомы и начальные этапы перемещения дочерних хромосом у динофлагеллят, как и у гипермастигид, происходят без участия кинетохорных микротрубочек. Конкретные механизмы данных процессов и то, каким образом в них принимают участие мембраны ядерной оболочки, пока остаются невыясненными.

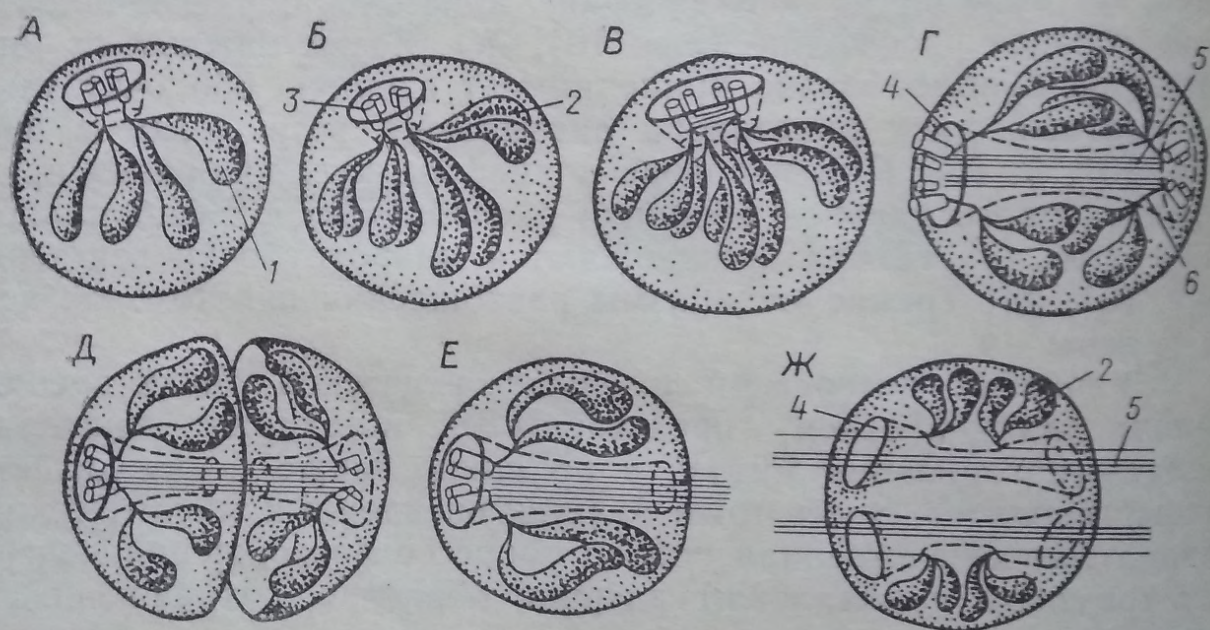


Рис. 102. Митоз у динофлагеллят (по: Kubaï, 1975).

А—Е — одноканальцевый, Ж — двухканальцевый. 1 — материнские и 2 — дочерние хромосомы, 3 — центриоли в зачатке продольного цитоплазматического канала, 4 — цитоплазматический канал, 5 — микротрубочки центрального веретена, 6 — кинетохорные микротрубочки.

Весьма интересен в этом плане митоз у эвгленонидов, где при наличии внутриядерного центрального микротрубочкового веретена нет морфологических признаков связи расходящихся дочерних хромосом ни с данной структурой, ни с мембранами ядерной оболочки. Такие парадоксальные митозы создают непреодолимые трудности для исследователей, применяющих сравнительный метод по принципу гомологии и стремящихся выявить пути эволюции митоза, поскольку они составляют большое



количество исключений, не укладывающихся в рамки той или иной гипотетической схемы.

При использовании сравнительно-цитологического метода по принципу функциональной аналогии и не ставя целью выяснение филогенетических связей между отдельными разновидностями митоза, исключения как раз и представляют наибольший интерес. В них обычно ярче всего проявляются те или иные стороны работы отдельных универсальных элементарных механизмов. Одним из путей выяснения организации митотических процессов является анализ всех или по крайней мере основных их специфических модификаций у разных эукариотных клеток. При этом интерес представляют не только низшие эукариоты, где разнообразие модификаций митоза наиболее велико, но и клетки высших эукариот, особенно специализированные метазойные клетки и клетки-организмы простейших и, в частности, инфузорий. Значение таких объектов для разработки общих и частных вопросов проблемы репродукции клеток было продемонстрировано на примере специфики мейотических делений, соматической полиплоидизации и весьма своеобразной организации процессов репродукции при формировании макронуклеусов у брюхоресничной инфузории стилонихии.

К рассмотренным выше примерам можно добавить еще достоверные факты о наличии оформленных актин-миозиновых структур в макронуклеусах некоторых инфузорий и участии микротрубочковой системы в процессах деления макронуклеусов инфузорий многих видов.

Однако для плодотворного сопоставления всех этих интереснейших сравнительных данных с относительно подробно исследованными метазойными митозами необходимо, чтобы глубина понимания организации этих митозов соответствовала бы степени их изученности у многоклеточных животных.



## ПРОЯВЛЕНИЕ ЕДИНСТВА ОРГАНИЗАЦИИ КЛЕТКИ В ЕЕ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ

В разделах книги, посвященных характеристике трех систем эукариотных клеток — поверхностного аппарата и цитоскелета, цитоплазмы с органоидами и ядерного аппарата — уже была сделана попытка показать глубокое единство всех компонентов этих систем и их взаимосвязь в реализации общих клеточных функций. В настоящей заключительной главе мы постараемся специально остановиться на этом вопросе, включив в него не только проблемы обеспечения общих функций эукариотных клеток, но и закономерности их изменений при адаптации и в процессе дифференцировки.

В 60-е годы нашего столетия было выполнено много работ по эмбриогенезу многоклеточных животных, начиная с развития их женских половых клеток. В проэмбриональный период происходит накопление в цитоплазме ооцитов запасных питательных веществ, рибосом, митохондрий, а также регуляторных белков и латентных форм информационных РНК, которые распределяются в цитоплазме ооцита неравномерно. Гетерогенность распределения информационных и регуляторных молекул имеет особое значение для дальнейшего развития.

После оплодотворения начинается энергичное деление клеток (обычно без роста цитоплазмы), в ходе которого идентичные по своим потенциям ядра оказываются в клеточных системах с неоднородной по своим свойствам цитоплазмой. Естественно, что при этом на начальных этапах появления различий между клетками ведущее значение принадлежит уже цитоплазме, которая с помощью неодинаковых наборов белковых регуляторных молекул начинает оказывать разное влияние на ядерный аппарат клеток. После окончания периода дробления главенствующую роль в процессах детерминации и дифференцировки клеток приобретают уже межклеточные взаимодействия — временные и постоянные контакты между клетками как одного,



так и (что особенно важно) разных зачатков. В осуществлении этих контактов участвуют клеточные рецепторы, сигналы с которых передаются на генетический аппарат. На более поздних стадиях развития эти сигналы еще более усложняются за счет появления межклеточных информативных молекул, а еще позднее и нервной и гуморальной интеграции.

Естественно, что по мере углубления наших представлений об организации эукариотных клеток непрерывно углублялись и наши представления о цитологических основах эмбриогенеза, дифференцировки и детерминации клеток в ходе развития.

Начиная с 60-х годов проблемы дифференцировки клеток интенсивно разрабатывались молекулярной генетикой. В то же время проводили и цитологические исследования — например, структурно-химической организации поверхностного аппарата при дифференцировке и малигнизации клеток. Поверхностные структуры клетки наиболее доступны для анализа тонкими методами, применяющимися в структурно-химических исследованиях. Это позволяет обнаружить даже незначительные изменения в проявлении активности генов, что существенно дополняет возможности молекулярно-генетического анализа. В итоге в предшествующие десятилетия углубились наши знания как об изменениях при дифференцировке самого генетического аппарата, так и о проявлении этих изменений в организации рецепторной системы клеток.

Одним из крупных достижений генетических исследований дифференцировки эукариотных клеток было создание концепции дифференциальной активности генов как основного генетического механизма клеточной специализации. Суть данной концепции заключается в предположении, что дифференцировка эукариотных клеток связана не со структурными изменениями генетического аппарата, а с изменениями аппарата регуляции активности генов. В доказательстве этой концепции важную роль сыграли цитологические исследования, наиболее яркими из которых были работы по пересадке ядер дифференцированных клеток в энуклеированную яйцеклетку амфибий. Из таких яйцеклеток развивались полноценные организмы, что свидетельствовало об отсутствии необратимых структурных изменений в геноме в ходе дифференцировки (во всяком случае, в геноме данных клеток).

Наряду с многочисленными фактами, подтверждающими теорию дифференциальной активности генов, при дальнейших исследованиях (особенно в сравнительно-цитологическом плане) стали накапливаться данные, указывающие на возможность различных перестроек генетического аппарата и его высокую потенциальную пластичность. К такого рода фактам относились рассмотренные выше изменения генома, происходящие при развитии макронуклеуса брюхоресничных инфузорий. Весьма показательно в этом отношении и широко распространенное в ооци-



тах разных животных явление амплификации генов ядрышкового организатора. О большой эволюционной пластичности генома свидетельствовала также гетерогенность генов рРНК, свойственная некоторым миксомицетам и инфузориям.

Помимо приведенных фактов к началу 70-х годов накопилось много частных вопросов, трудно объяснимых с позиций теории дифференциальной активности генов в ее первой формулировке. Одной из «классических» неразрешимых проблем была проблема дифференцировки большого количества разных клонов иммунокомпетентных клеток, жестко детерминированных на синтез лишь одной, специфичной для каждого клона разновидности молекул иммуноглобулинов. При этом иммуноглобулины, синтезируемые иммунокомпетентными клетками разных клонов, различаются только по аминокислотной последовательности в первом переменном домене. Константная (основная) часть тяжелой цепи иммуноглобулина идентична у всех клонов и кодируется, очевидно, относительно небольшим количеством структурных генов. Неясными оставались вопросы о том, каким образом возникает большое разнообразие переменных участков молекулы иммуноглобулина, каковы механизмы объединения генов переменных и константных участков в ДНК одной хромосомы и каким образом в ходе антигензависимой дифференцировки происходит переключение синтеза иммуноглобулинов одного класса (М) на синтез иммуноглобулинов других классов (D, G, A, E).

В начале 70-х годов широкое распространение получила гипотеза «соматических мутаций», объясняющая разнообразие иммунокомпетентных клеток повышенной мутабельностью участков ДНК, содержащих гены переменной части молекулы иммуноглобулинов. Такого рода объяснения противоречили данным по дифференцировке других специализированных клеток и не принимались многими исследователями.

Наконец, сенсационным, с точки зрения представлений о стабильности и структурной целостности генетического аппарата было открытие так называемых блуждающих генов — генов, способных менять положение в хромосоме. Эти мобильные гены сходны с эндогенными ретровирусами, обладают значительной автономией внутри генетического аппарата, транскрибируются независимо и могут существенно влиять на работу генома.

Все названные факты и несоответствия постепенно создали базу для пересмотра первоначальной формулировки теории дифференциальной активности генов и, в частности, для смягчения ее основного положения о полном отсутствии структурных изменений ДНК при дифференцировке клеток.

В середине 70-х годов удалось, в частности, показать, что в процессе дифференцировки иммунокомпетентных клеток при переключении синтеза иммуноглобулинов класса М на иммуно-



глобулин класса D имеет место альтернативный сплайсинг: при этом интроном является не концевая часть молекулы, а участок, несущий информацию о константном домене тяжелой цепи иммуноглобулина класса M. В случае же переключения синтеза на иммуноглобулины других классов (G, E, A) происходит перестройка с образованием петли ДНК и возникновением временной сшивки между геном, кодирующим константный участок

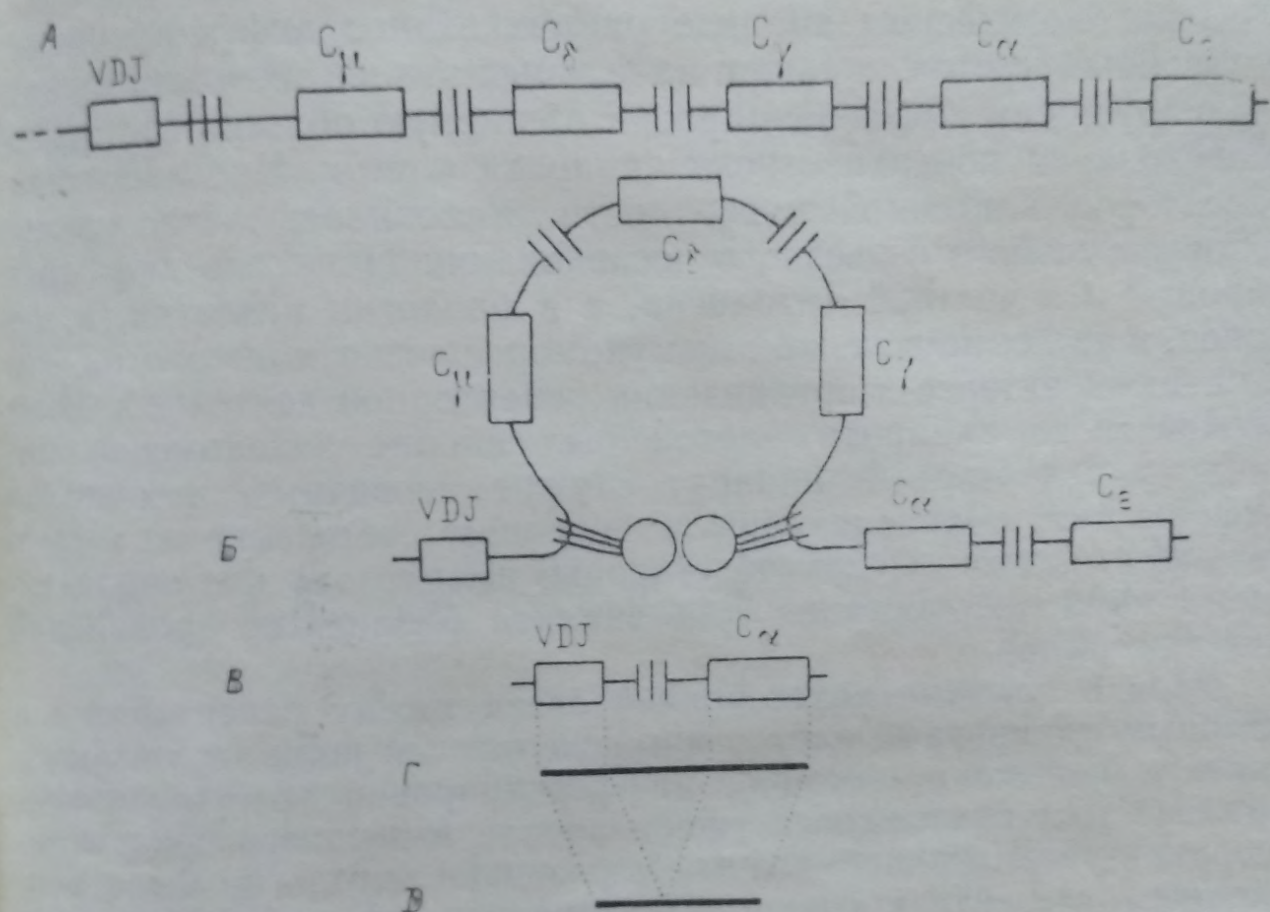


Рис. 103. Образование иРНК для тяжелых цепей иммуноглобулинов класса A при антигензависимой дифференцировке В-лимфоцитов.

A — гены, кодирующие переменные и константные домены тяжелой цепи иммуноглобулинов иммунокомпетентного В-лимфоцита; B — участок ДНК (петля), содержащий гены константных доменов тяжелых цепей иммуноглобулинов класса M, D и G; B — реорганизованный ген, кодирующий переменные и константные домены тяжелой цепи иммуноглобулина класса A; Г, Д — сплайсинг иРНК. VDJ — генные сегменты, кодирующие переменные домены тяжелой цепи;  $C_{\mu}$  —  $C_{\epsilon}$  — гены, кодирующие константные домены тяжелой цепи.

иммуноглобулина соответствующего класса и геном переменного участка тяжелой цепи. Участки ДНК, кодирующие иммуноглобулины других классов, оказываются при этом расположенными в петле и как бы выключенными из работы генома (рис. 103). Следовательно, в процессе антигензависимой дифференцировки иммунокомпетентной клетки как бы формируется специфичный только для нее комплексный ген, с которого и считывается затем соответствующая иРНК для всей тяжелой цепи иммуноглобулина уже нового класса.

Аналогичный механизм функционирует в ходе дифференци-



ровки эритроцитов, последовательное включение в онтогенезе разных глобиновых генов осуществляется также с помощью возникновения временных сшивок между несущими необходимую информацию участками ДНК и «выключения» генов, завершивших свою роль, путем образования петлевидных структур. Итак, в данных случаях был обнаружен новый механизм работы генетического аппарата, отражающий его относительную пластичность.

В цитологическом анализе ранних этапов дифференцировки метазойных клеток, а также начальных этапов их малигнизации при нарушении дифференцировки обширную область составляли исследования поверхностного аппарата клеток. Характеристика рецепторов клеточной поверхности становилась обязательным условием любого серьезного исследования процессов дифференцировки и в частной цитологии, и в биологии развития, и, наконец, в таких науках, как иммуноморфология и онкология. Повышенный интерес к организации рецепторной деятельности поверхностного аппарата клеток был вполне закономерен, поскольку рецепторный аппарат служит первичным источником информации, определяющим в конечном счете всю жизнедеятельность клеток. С другой стороны, именно эта клеточная система наиболее доступна для анализа различных проявлений действия генов.

Идея о наличии двусторонней связи между рецепторным и ядерным аппаратами клетки и определяющей роли этой взаимосвязи в процессах клеточной дифференцировки достаточно тривиальна и высказывалась уже в начале нынешнего века. Спецификой рассматриваемого этапа развития цитологии была возможность перейти к конкретному анализу структурно-биохимической организации рецепторов и их функций. В таком плане были достигнуты определенные успехи; например, удалось выделить и охарактеризовать ряд белковых рецепторов (иммуноглобулиновые рецепторы В-лимфоцитов, рецепторы к инсулину и ацетилхолину и к некоторым другим гормонам и медиаторам), проследить изменение гликопротеидов и иных мембранных компонентов при эритропоэзе, дифференцировке В- и Т-лимфоцитов и в других процессах. Крупным успехом в каузальном анализе рецепторной функции мембран явилось выяснение роли фибронектина и других белков клеточной адгезии при нормальной и патологической дифференцировке культивируемых *in vitro* клеток.

Несмотря на различие объектов, методов и конкретных задач, два рассмотренных направления исследований: молекулярно-генетический подход к изучению изменений ДНК и процессов транскрипции и цитологический анализ изменений структурно-биохимической организации поверхностного аппарата при специализации клеток, постепенно приобретали целостный взаимосвязанный характер. Это происходило из-за внедрения в со-



знание исследователей мысли о наличии глубокой взаимозависимости данных процессов, заключающейся не только в проявлении действия генов на организацию поверхностного аппарата, но и в том, что изменения поверхностного аппарата могут вызывать прогрессирующие изменения в геноме.

Взаимодействие между этими клеточными системами осуществляется через сложный рабочий аппарат цитоплазмы и различные ядерные структуры. Естественно, что для дискретного анализа механизмов дифференцировки исключительно важное значение имело изучение изменений, происходящих в процессе дифференцировки и в этих клеточных структурах. Оно было необходимо и для выяснения собственно механизмов двусторонней передачи сигналов между генетическим и рецепторным аппаратами клеток, и для анализа регуляторных систем, участвующих в передаче.

Конкретный анализ промежуточных механизмов стал возможен на основе успехов, достигнутых в изучении организации и взаимосвязи субсистем рабочего аппарата цитоплазмы и ядерных вспомогательных структур. Следует особо выделить работы, посвященные сложным процессам созревания продуктов транскрипции, приводящим к формированию зрелых форм информационных РНК, и механизмам внутриклеточного транспорта этих молекул.

Не менее важным и крупным достижением являлось установление характера взаимосвязи главных органоидов рабочего аппарата цитоплазмы. Это нашло отражение в основных положениях теории потока дифференцирующихся мембран. Несмотря на то, что это обобщение в классическом виде просуществовало недолго, оно было чрезвычайно существенно для разработки проблемы дифференцировки, так как давало возможность наметить точки приложения регулирующих факторов в процессах сложной трансформации мембранных структур, примембранного цитозоля и внутренней, ограниченной мембранами фазы цитоплазмы.

Большую роль в этом же плане играли успехи, достигнутые в изучении организации кatabолической лизосомной системы и ее сложных взаимоотношений с анаболическими системами клетки. Так, для разработки проблемы дифференцировки значительный интерес представляло исследование регуляторной функции лизосомной системы.

Существенный прогресс отмечался и в анализе механизмов регуляторного действия на геном со стороны гормонов — как стероидных, так и пептидных. Удалось установить химическую природу цитоплазматических рецепторов стероидных гормонов и в общем виде охарактеризовать их взаимодействие с ДНК. Были также выявлены первичные изменения в метаболизме клеток при специфической активации рецепторов поверхностного аппарата. Была продемонстрирована важная роль циклической



АМФ и других вторичных мессенджеров в изменениях клеточного метаболизма при активации рецепторов.

Успехи анализа проблемы дифференцировки можно продемонстрировать на следующем примере: исследовании синтеза лизосомальной  $\beta$ -глюкуронидазы в клетках почечного эпителия мышей. В конце 70-х годов было выяснено, что появление указанного фермента в лизосомах отмечается на определенном этапе гистогенеза почки и обусловлено активацией так называемого Gus-комплекса генов, расположенных в 5-й хромосоме (рис. 104). Этот комплекс состоит из структурного гена (S) и трех регуляторных генов: *g*, *t*, *u*. Регуляторный ген *g* активируется комплексом, образованным андрогеном — стероидным гормоном, попадающим в клетку извне, — со специальным белковым рецептором к этому гормону, который синтезируется клеткой на основе информационной РНК, считываемой со структурного гена *t*, расположенного в X-хромосоме. Активация регуляторного гена *g* комплексом андрогена и рецепторного белка увеличивает интенсивность транскрипции структурного гена Gus-комплекса в 250 раз. Регуляторный ген *t* обеспечивает возможность транскрипции структурного гена лишь на определенной стадии онтогенеза. Активируется он специфическими сигналами от рецепторов к гормону роста, расположенных в плазматической мембране. Регуляторный ген *u* контролирует уровень фермента в тканях.

Регуляция работы структурного гена Gus-комплекса не ограничивается такими многоэтапными взаимодействиями. При образовании дефинитивной тетрамерной молекулы фермента  $\beta$ -глюкуронидазы наблюдаются и сложные процессы посттрансляционной регуляции. В результате посттрансляционных изменений из единого фонда мономеров возникают две формы фермента (L и X), отличающиеся по составу углеводных компонентов и С-концевым аминокислотным последовательностям и играющие разную роль в жизнедеятельности клеток. Глюкуронидаза формы L включается в состав лизосом и может выводиться из клетки путем экзоцитоза. Вторая форма фермента (изоформа X) в заметных количествах возникает лишь при условии активации структурного гена *Eg*, расположенного в 8-й хромосоме. Информационная РНК, синтезированная на этом гене, транслируется на цитоплазматических рибосомах с образованием гидрофобного белка эгазина. С его помощью изоформа X  $\beta$ -глюкуронидазы встраивается в мембрану ЭПС.

К настоящему времени синтез  $\beta$ -глюкуронидазы стал модельной системой для изучения генетического полиморфизма, гормональной индукции, процессинга лизосомальных гидролаз и механизмов внутриклеточной локализации ферментов. Интерес к этому белку обусловлен еще и его эволюционной консервативностью — у человека и *E. coli* существует значительная гомология по последовательностям ДНК, кодирующим  $\beta$ -глюку-



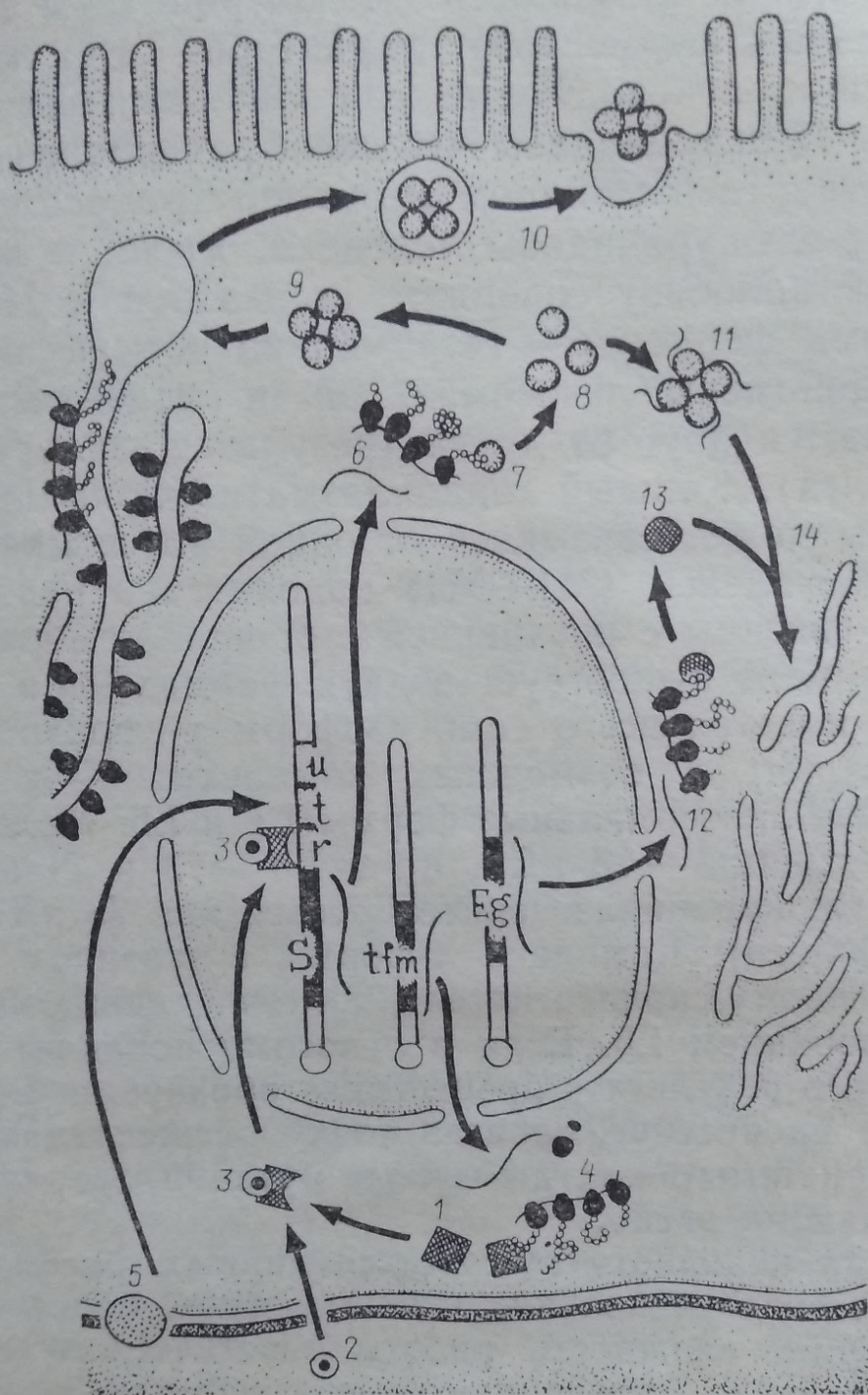


Рис. 104. Схема синтеза и созревания  $\beta$ -глюкуронидазы в клетке почечного эпителия мыши (по: Rindt, Nover, 1980).

Srtu — система структурного (S) и регуляторных (tru) генов Gus-комплекса, ответственных за синтез  $\beta$ -глюкуронидазы в хромосоме 5; tim — структурный ген X-хромосомы, кодирующий иРНК для синтеза цитоплазматических рецепторов к стероидному гормону; Eg — структурный ген хромосомы 8, кодирующий иРНК для синтеза гидрофобного белка эгазина. 1 — белок-рецептор; 2 — стероидный гормон; 3 — комплекс белка-рецептора со стероидным гормоном; 4 — синтез белка-рецептора на полисомах; 5 — рецептор плазматической мембраны к гормону роста; 6 — иРНК и синтез на полисомах мономера  $\beta$ -глюкуронидазы; 7 — мономерный белок; 8 — общий фонд мономеров для образования изоформ фермента  $\beta$ -глюкуронидазы; 9 — тетрамерная изоформа L; 10 — форма X; 12 — иРНК и синтез на полисомах гидрофобного белка эгазина; 13 — молекула эгазина; 14 — образование комплекса эгазина с глюкуронидазой X и включение его в мембраны гладкой ЭПС.



ронидазу. Сейчас это один из наиболее изученных белков млекопитающих. Этот фермент участвует в деградации глюкозаминогликанов. Высокая активность  $\beta$ -глюкуронидазы (как и других лизосомальных ферментов) характерна для макрофагов, печени, селезенки, почек. Экспрессия Gus-комплекса тканеспецифична. Гены глюкуронидазы человека расположены в хромосоме 7, в участке, гомологичном мышинной хромосоме 5. Клонирована ДНК  $\beta$ -глюкуронидазы человека, мыши и крысы. Мышинный ген (14 килобаз) содержит 12 экзонов и 11 интронов. Активная форма фермента — тетрамер из четырех идентичных субъединиц; мономеры лизосомальной и эндоплазматической формы отличаются друг от друга (результат посттрансляционного процессинга). Каждый «эндоплазматический» тетрамер  $\beta$ -глюкуронидазы может связывать от одной до четырех молекул эгазина; эти комплексы (M1—M4) находятся в просвете ЭПС или непрочно связаны с внутренней стороной мембраны. Лизосомальный фермент существует в двух формах — La и Lb. Таким образом, имеется всего семь изоформ  $\beta$ -глюкуронидазы — свободная X, четыре возможных комплекса X с эгазином (M1—M4) и две лизосомальные формы La и Lb. Молекулярная масса X-субъединицы — 75 кДа, La и Lb — 73 и 71 кДа, соответственно.  $\beta$ -глюкуронидаза синтезируется как 75 кДа-предшественник (X-форма). Комплекс X-формы с эгазином, транслируясь в лизосому, подвергается протеолитическому процессингу с образованием Lb. Если в лизосому попадает X-форма без эгазина, то в результате процессинга образуется La. Эгазин модифицирует процессинг, сдвигая точку расщепления молекулы. Для этой системы известны генные мутации, затрагивающие практически каждое звено.

Несмотря на неполноту имеющихся данных, рассмотренный пример интересен в нескольких отношениях. С одной стороны, он демонстрирует сложность работы генетического аппарата эукариотной клетки. Активация синтеза одного фермента не просто связана с активацией одного структурного гена, а обуславливается сложным взаимодействием целой системы регуляторных генов той же хромосомы и еще по крайней мере двух систем генов, расположенных в других хромосомах. Второй особенностью этой системы является определяющая роль рецепторов поверхностного аппарата в активации работы генов. Наконец, в данной системе отчетливо выражены существенные изменения, происходящие уже на посттрансляционном уровне и приводящие, в частности, к возникновению двух ферментов, кодируемых одним геном, но отличающихся и по биологическому значению, и по конечной структуре. Таким образом, организация синтеза  $\beta$ -глюкуронидазы — одна из немногих систем, позволивших в какой-то мере приблизиться к интегративному анализу проблемы клеточной дифференцировки.

За последнее время интенсифицировались также исследова-



ния рабочего аппарата клеток (особенно их цитоскелета и мембранных органоидов); значительно расширились и углубились сравнительные цитологические и молекулярно-генетические исследования. На их основе были высказаны интересные новые эволюционные обобщения.

Как уже отмечалось выше (см. гл. 4), в истекшее десятилетие наиболее характерными направлениями в анализе ядерного аппарата были следующие: углубленное изучение организации и функции генов; изучение организации вспомогательных ядерных структур (ядерного матрикса); попытка интегративного подхода к анализу экспрессии генов и их регуляции и, наконец, попытки дать эволюционную трактовку новым фактам по организации генома.

За истекшее десятилетие сильно углубились наши представления о функциональной и структурной лабильности генома. Структурная лабильность подтверждается наличием, во-первых, упомянутых выше мобильных диспергированных элементов и, во-вторых, — закономерных структурных перестроек ДНК в процессе клеточной дифференцировки. Наиболее характерным и хорошо изученным примером таких перестроек ДНК является формирование генов, кодирующих переменные домены тяжелых цепей иммуноглобулинов. В геноме каждого клона дифференцирующихся В-лимфоцитов имеет место существенная структурная перестройка (реаранжировка) генов, кодирующих иРНК белковых цепей иммуноглобулинов (рис. 103). При этом имеет место в каждом случае специфическая утрата определенных участков ДНК и образование для переменных доменов тяжелых цепей иммуноглобулинов каждого клона гена из трех альтернативных вариантов (V, D, J), специфического только для этого клона. У птиц аналогичный результат при формировании генов для переменных доменов легких цепей иммуноглобулинов достигается при помощи так называемой конверсии, т. е. образования специфического для каждого клона гена путем объединения единственного функционирующего гена для переменного домена с произвольно выбранным участком одного из 20 имеющихся в геноме псевдогенов. По-видимому, такого рода структурные перестройки имеют широкое распространение. Помимо приведенных примеров подобные явления наблюдаются у дрожжей при формировании генов, определяющих типы их спаривания. Нечто аналогичное происходит, по-видимому, при дифференцировке у некоторых лишайников и при формировании поверхностных рецепторов у трипаносомид. Столь широкий круг объектов, процессы дифференцировки которых определяются не только изменением регуляции работы генома, но и его структурными перестройками, свидетельствует о значительном распространении этого механизма.

Весьма существенные коррективы в понимании организации генома и принципов его эволюционной динамики внесли иссле-



дования истекшего десятилетия, посвященные лабильным «прыгающим» генам.

По мнению многих молекулярных генетиков, мобильные элементы имеют большое значение и в организации и в эволюции генома. Наличие в составе транспозонов обычных генов, в том числе и регуляторных, может оказывать существенное влияние на экспрессию генов, возможны изменения и адаптивного характера. Разнообразные механизмы транспозиции (перемещения генов) могут служить мощным источником дупликации генов, по-видимому, широко используемой в эволюционной динамике генетических систем эукариотных клеток. Возможно, что такая дупликация является начальным этапом их дивергентной дифференцировки.

Однако в повседневной жизнедеятельности эукариотных клеток, в процессах их дифференцировки и эволюции, преобладают изменения регуляции экспрессии генов, не связанные обычно с их структурной перестройкой.

Исследование процессов регуляции шло в основном в двух направлениях — характеристика белков-регуляторов, обеспечивающих непосредственное включение и выключение конкретных генов, и анализ организации и механизмов действия особых регуляторных последовательностей — усилителей (энхансеров) или «глушителей» (сайленсеров) транскрипции.

Еще одним новым интенсивно развивающимся молекулярно-генетическим направлением, имеющим непосредственное отношение к проблемам дифференцировки, является открытие особых генов (гомеодоменные гены), кодирующих белки, обеспечивающих регуляторные функции в морфогенезе. Они определяют последовательность включения генов в развитии. Эти белки весьма консервативны и обладают большой степенью гомологии у амфибий, человека и дрозофилы.

Примером успехов в выяснении значения и механизмов действия регуляторных генов в процессах дифференцировки могут служить данные по искусственному превращению культивируемых *in vitro* эмбриональных фибробластов в миобласты путем введения в их геном работающего гена миобласта с активным промотором и энхансером. Часть фибробластов, включающих в геном этот ген, превратились в типичные миобласты и стали образовывать мышечные волокна — симпласты. Иными словами, действие синтезируемых новых регуляторных белков вызвало активацию большого количества структурных генов, специфичных для мышечных клеток и обычно стойко заблокированных в фибробластах.

Отмеченные выше достижения молекулярно-генетических исследований ядерных геномов эукариотных клеток коррелируются углублением наших знаний и в отношении вспомогательных ядерных структур. В настоящее время сложилось убеждение в существовании ядерного матрикса, хотя вопрос о его конкретной



организации вызывает еще большие дискуссии. Тем не менее достаточно четко установлено наличие разносторонних структурных и функциональных связей матрикса с ДНП (рис. 105).

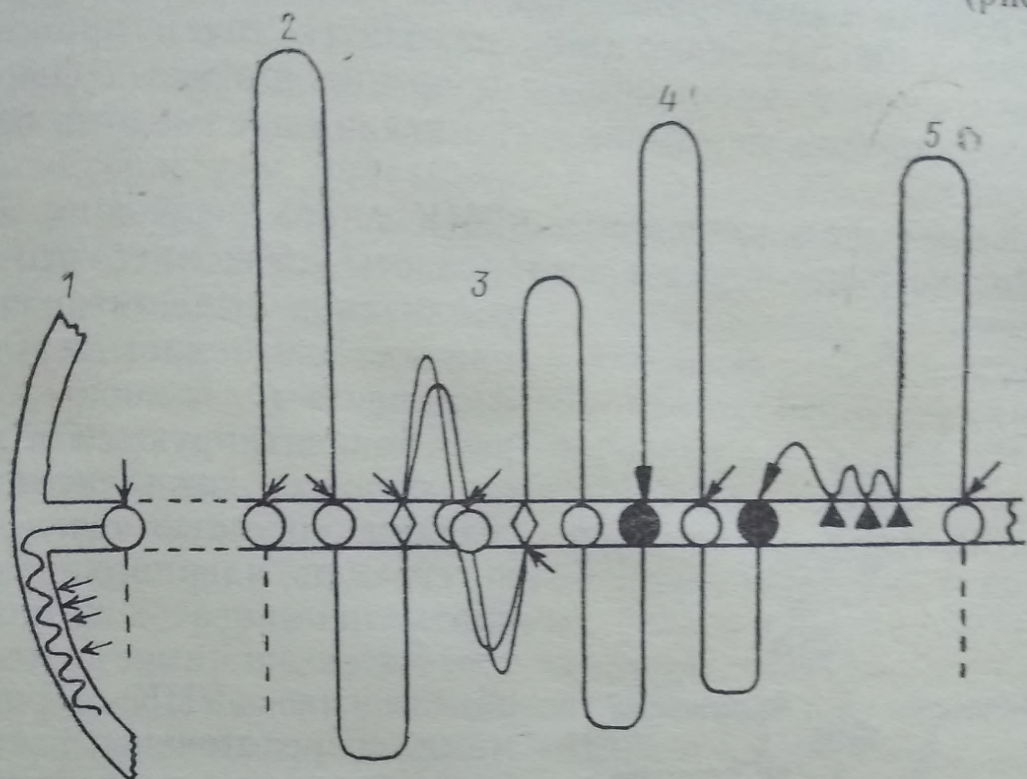


Рис. 105. Способ прикрепления ДНК к ядерному матриксу (по: Георгиев, 1989).

1 — прикрепление к ядерной ламине через сателлитную ДНК; 2—5 — прикрепление петель ДНК (2 — неактивной, 3 — реплицирующейся, 4 — содержащей потенциально активный ген, 5 — содержащей работающий ген) через *origins* (светлые кружки), репликативные вилки (светлые ромбы), 5'-область (черные кружки) и дополнительные сайты (черные ромбы) по длине гена.

Интеграцию структур ядерного аппарата иллюстрируют исследования последнего десятилетия, посвященные информационной РНК. В многочисленных работах показано, что транспорт ее в цитоплазму представляет собой закономерно организованный структурированный процесс, в котором принимают участие ядерный матрикс, оболочка ядра с его поровыми комплексами и связанные с ней компоненты цитоскелета цитоплазмы. Процесс этот распадается на три этапа: движение по ядерному матриксу, транслокация через поровые комплексы и движение по цитоплазматическим промежуточным филаментам. На первом этапе транспорт коррелирует с созреванием гетерогенной РНК. Вероятно, какую-то роль в этом могут играть изменения в актиновых структурах. Достоверно показано, что сплайсинг и преобразование на концах молекулы РНК протекают в тесной структурной связи самой молекулы и одевающих ее белков с матриксом. Последний обуславливает при этом направленное перемещение формирующихся информационных РНК к поровым комплексам. Как указывалось выше, транслокация через них также представляет собой структурированный процесс.

В работах истекшего десятилетия удалось установить, что



контроль за транспортом иРНК из ядра в цитоплазму и, следовательно, регуляция экспрессии генов на этом уровне осуществляется именно в ходе транслокации иРНК через поровые комплексы (рис. 106). Именно здесь находятся точки приложения действия гормонов, канцерогенов и других активных факторов, регулирующих это важнейшее звено ядерно-плазменных взаимоотношений.

Последний этап транспорта иРНК и его регуляция изучен хуже. Только в последнее время удалось установить, что в его

реализации существенная роль принадлежит промежуточным филаментам, С-концы которых концентрируются в области поровых комплексов. Они создают хорошую основу для интеграции ядерного и цитоплазматического цитоскелетов. Здесь же имеет место и объединение иРНК с рибосомами, сосредоточены факторы, регулирующие трансляцию и длительность жизни иРНК.

Для дальнейшей разработки этой проблемы необходимы более детальные сведения о химической организации поровых комплексов и ядерного матрикса, а также структурной и функциональной их взаимосвязи и связи с элементами цитоскелета. Как указывалось выше, именно в этом плане намечается тенденция к интегративному подходу в анализе организации эукариотных клеток.

Такой интегративный подход особенно ярко проявляется в стремлении объединить молекулярно-биологические исследования рецепторного аппарата клеток и молекулярно-генетические работы по организации и эволюции генов.

Такого рода работы особенно удобно проводить на развивающихся зародышах, когда имеет место взаимодействие клеток различных зачатков и взаимодействие клеток и формируемых ими межклеточных структур. В результате всего этого происходит экспрессия тканеспецифических генов и, наоборот, стойкое блокирование генов, кодирующих белки, нехарактерные для данного типа дифференцировки. Как указывалось выше, важное значение в межклеточных взаимодействиях имеют следующие

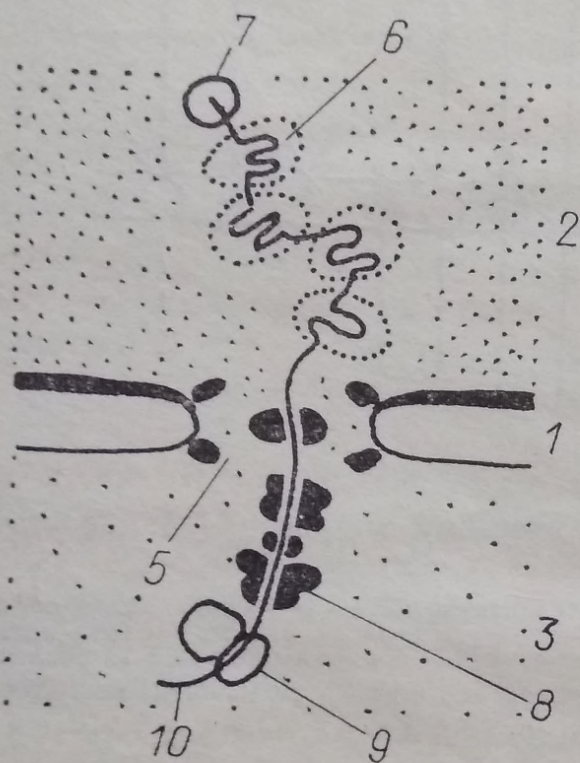


Рис. 106. Прохождение РНП-частицы через ядерную пору (по: Alberts e. a., 1989).

1 — ядерная оболочка, 2 — кариоплазма, 3 — цитоплазма, 4 — РНП-частица, 5 — ядерная пора, 6 — информиферы, 7 — полиА-конец предшественника иРНК, 8 — белки информосомы, 9 — рибосома, 10 — иРНК.



три категории клеточных рецепторов и связанных с ними веществ — рецепторы клеточной адгезии (определяющие как связи между клетками, так и адгезию к субстрату), специфические выделяемые клеткой субстраты типа фибронектина и, наконец, молекулы, участвующие в образовании межклеточных контактов. В настоящее время удалось выявить, идентифицировать и дать характеристику молекулярной структуры белков и кодирующих их генов для нескольких рецепторов клеточной адгезии (L-CAM, N-CAM, A-CAM, N-кадхерин и другие). Удалось также показать их неравномерное распределение на поверхности клеток различных зачатков в эмбрионе позвоночных. Рецепторы, гомологичные рецепторам клеток зародышей позвоночных, обнаружены и у клеток эмбрионов дрозофилы, что свидетельствует о существенном значении этих структур в процессах эмбрионального развития и в становлении детерминации и дифференцировки клеток. С другой стороны, широкое распространение родственных рецепторных белков говорит о большой «древности» их происхождения в эволюции многоклеточных животных. В специальных экспериментах с двумя белками-рецепторами на куриных зародышах (N-CAM и L-CAM) Д. Эдельману удалось показать их прямое участие в регуляции экспрессии генов, обеспечивающих процесс кератинизации в эпителиальных клетках при развитии перьев. На основании этих и многочисленных других экспериментальных данных, полученных на клетках различных зачатков, была сформулирована так называемая морфорегуляторная гипотеза. По этой гипотезе рецепторы клеточной адгезии и рецепторы к выделяемым клетками специфическим субстратам имеют существенное регуляторное значение как структуры, обеспечивающие необходимой информацией клетки многоклеточных животных на определенных этапах развития. Эта информация определяет поведение клеток и, что самое главное, обеспечивает экспрессию в них тканеспецифических генов.

Особенно интересным и неожиданным оказалось то обстоятельство, что многие рецепторы клеточной адгезии имеют доменную структуру и обнаруживают отчетливую гомологию с белками надсемейства иммуноглобулинов.

Наличие такой глубокой гомологии, проявляющейся и в аминокислотной последовательности и во вторичной структуре доменов, создает предпосылки для формулировки интересной гипотезы о происхождении всего надсемейства иммуноглобулинов. В него помимо общепринятой классификации включены еще гены, кодирующие рецепторы клеточной адгезии, фибронектин, рецепторы гормонов, дифференцировочные антигены и белки-рецепторы к миелину. Основанием для такого расширения этого надсемейства генов помимо указанных выше фактов служат и сравнительные данные по наличию аналогичных белков у насекомых при отсутствии у них системы иммунитета. В поль-



зу этого свидетельствуют также и новые представления об эволюции генов (широкое распространение дупликации генов, возможности их перемещения в геноме, а также комбинации экзон-интронных перестроек и адаптивной дивергенции родственных многократно дублированных генов).

Автор этой концепции исходит из идеи о первичности древних генов, кодирующих белки-рецепторы межклеточной адгезии у первичных многоклеточных животных, и более позднем появлении на их основе как универсальных для всех многоклеточных белков-рецепторов (современные белки межклеточной адгезии, дифференцировочные антигены, рецепторы к гормонам), так и специфичных только для позвоночных животных (рецепторы антигенов, иммуноглобулины).

Важным положением этой эволюционной концепции является представление о том, что в эволюции генов, приводящей к возникновению таких мощных надсемейств, сочетаются процессы дивергенции и параллельной направленной эволюции.

Параллельное развитие и сохранение глубокого сходства в гомологичных надсемействах генов, а также независимое возникновение новых сходных признаков, обуславливаются тем обстоятельством, что становится возможной их коэволюция. Более того, семейство может становиться ловушкой для мутаций, благодаря чему полезные мутации могут распространяться среди членов семейства, и в совокупности с давлением отбора эволюция приобретает закономерный направленный характер.

Эти идеи об особенностях эволюционной динамики родственных семейств и надсемейств генов, высказанные Д. Эдельманом и Л. Гэлли еще в конце 60-х годов, в настоящее время в свете новых данных разделяются многими молекулярными генетиками и, по-видимому, справедливы не только для надсемейства иммуноглобулиновых генов или точнее надсемейства генов межклеточных взаимодействий, но и для генов других семейств и надсемейств. Исследование конкретной эволюционной динамики отдельных генных семейств представляет в настоящее время одно из интенсивно развивающихся новых направлений клеточной биологии.

Например, углубленные исследования таких универсальных насосов, как  $K$ ,  $Na$ -АТФаза, показали, что они представлены в геноме не одним (уникальным) структурным геном, а целым семейством отличающихся друг от друга генов когда-то дивергировавших, но сохранивших общие принципы работы.

Эти принципиально новые данные в отношении так называемых уникальных структурных генов наносят ощутимый удар по концепции универсализации и в особенности представлениям об универсальных блоках. Как известно, эта концепция отрицает возможность существенных вариантов организации структур на молекулярном и надмолекулярном уровнях и сводит все изменения на этих уровнях к комбинаторике типичных блоков.



По нашему мнению, в свете приведенных выше данных более справедливым будет допущение наличия дивергентной эволюции, хотя и ограниченной достаточно жесткими рамками общих функциональных задач, предъявляемых к конкретным структурам.

Во всяком случае, представления о широком распространении и закономерном характере эволюционной динамики генных семейств и надсемейств лучше коррелируют с приведенным в книге сравнительно-цитологическим материалом, свидетельствующим о широком распространении явлений параллелизма в организации клеточных систем. Эволюционная динамика проявляется не в комбинаторике тождественных блоков, а в сходных вариантах их организации, специфичных для каждого исследованного объекта.

С этой точки зрения специального внимания заслуживают широкие сравнительные молекулярно-генетические исследования организации геномов у митохондрий и хлоропластов в сопоставлении с вариантами организации геномов про- и эукариот. Как отмечалось выше, эти работы уже дали и несомненно еще дадут много фактов для анализа общих принципов организации и эволюции генетических систем клеток. Независимо от происхождения этих органоидов, на их примере мы имеем уникальный длительный «эксперимент» природы с своеобразными полуавтономными геномами, проявляющими в этом эксперименте ряд потенций, не обнаруженных пока ни у про-, ни у эукариотных геномов.

Вообще тенденцию к расширению круга объектов и обилие работ по сравнительному анализу организации клеток с привлечением самых современных методов исследования следует считать одной из наиболее прогрессивных тенденций в науке о клетке.

В понимании единства клеточной организации существенное значение имеют не только кратко разобранные выше исследования двусторонних взаимодействий между рецепторными системами поверхностного аппарата и геномом клеток, но и исследования роли в этих взаимодействиях рабочего аппарата клетки — ее цитоплазмы, цитоскелета и мембранных органоидов.

В этом плане в истекшее десятилетие существенно углубились наши представления о системах вторичных мессенджеров, которые обеспечивают передачу сигналов как в пределах поверхностного аппарата и мембранных систем цитоплазмы, так и на генетический аппарат клеток.

Необходимо, однако, отметить, что если первые этапы структурной организации этих процессов начинают уже конкретизироваться, то промежуточные и конечные этапы исследованы пока слабо.

Еще хуже обстоят дела с анализом влияния катаболического



аппарата лизосом на генетический аппарат клеток. Наметившееся в предыдущем десятилетии интересное направление в «лизосомологии» не получило большого развития в 80-е годы. Значительно больших успехов в плане интегративного подхода удалось добиться в разработке проблемы опосредованного рецепторами эндоцитоза.

Это направление привело к открытию нового органоида клеток, отвечающего за регуляторную распределительную и сортировочную функцию. Эти органоиды — рецептосомы и эндосомы — обеспечивают также и рециклику рецепторов.

Существенные изменения произошли в истекшее десятилетие и в нашем понимании взаимодействия мембранных структур клеток. На смену казавшейся весьма привлекательной в 70-х годах теории потока дифференцирующихся мембран пришли представления о специфике мембранных органоидов и широком распространении транспортных рециклирующих систем, обеспечивающих связь этих органоидов друг с другом и с плазматической мембраной.

Определенные успехи достигнуты в анализе ответа клеток на внешние воздействия. Такие исследования способствуют выявлению «нормы реакции» клеток, раскрывая их потенции, что в свою очередь позволяет лучше понять, как обеспечивается функционирование тех или иных клеточных систем и клетки в целом в нормальных условиях.

Большой и важной областью подобных исследований является изучение адаптаций биологических систем к изменениям факторов среды. Эта проблема охватывает чрезвычайно широкий круг вопросов, имеющих самостоятельное значение, и приобретает в наше время особую актуальность в связи с обострением экологической ситуации. Однако, обсуждая здесь эти вопросы, мы остановимся в основном на тех аспектах проблемы адаптации, которые имеют непосредственное отношение к клеточному уровню организации.

Одно из самых удачных определений понятия «адаптация», принадлежащее Г. В. Шкорбатову, гласит: «Адаптация (приспособление) — это совокупность реакций биологической системы, поддерживающих ее функциональную устойчивость при изменении условий окружающей среды». Феномен адаптации тесно связан с таким свойством биологических систем, как надежность. Надежность биосистем обеспечивается разными способами — это и безотказное функционирование отдельных компонентов системы, и их дублирование, существование альтернативных механизмов, обеспечивающих выполнение данной функции, и др.

Дублирование компонентов системы и наличие альтернативных путей, которые обуславливают надежность ее работы, отчетливо выявляются в организации цитоскелета. Как мы уже видели, существует очень большое количество регуляторных



белков, обеспечивающих функционирование системы актиновых микрофиламентов, причем многие из них, имея общие свойства, выполняют одни и те же функции. Найдены мутанты, которые могут обходиться без любого из компонентов микрофибрилярного аппарата — его функции, по-видимому, берут на себя другие звенья системы. Те же закономерности прослеживаются и в организации микротрубочек, промежуточных филаментов и цитоскелета в целом. Примером лабильности этой системы и надежности ее организации может служить, во-первых, отсутствие всех трех компонентов нормального цитоскелета в сперматозоидах нематод и других близких видов (функционирование этих клеток обеспечивается за счет системы так называемых тонких филаментов) и, во-вторых, отсутствие актиновых микрофиламентов у трипаносом, в геноме которых имеются актиновые гены, но в результате точечной мутации (замены всего одной аминокислоты) молекулы оказываются лишенными способности к полимеризации и, следовательно, в этих клетках невозможна сборка актиновых микрофиламентов. Тем не менее, трипаносомы прекрасно существуют за счет мощно развитой системы микротрубочек.

Надежность биологических систем должна обеспечиваться на самых разных уровнях организации — от молекулярного до организменного. Так, например, повреждения молекулы ДНК могут вызвать серьезные нарушения жизнедеятельности и даже гибель клетки. В связи с этим большое значение в обеспечении надежности приобретают системы репарации ДНК. Их известно несколько. Многие клетки обладают способностью к синтезу ферментов репарации ДНК в ответ на повреждение ДНК. Так, у *E. coli* любое нарушение репликации ДНК, вызванное повреждением, является сигналом, индуцирующим транскрипцию более 15 различных генов, многие из которых кодируют белки, участвующие в репарации ДНК (так называемый SOS-ответ). В первую очередь активируется ген, контролирующий синтез белка Rec A. Этот белок был идентифицирован еще в 1965 году как необходимый для конъюгации хромосом. Он представляет собой ДНК-зависимую АТФазу (молекулярной массой 38 кДа) и играет роль в генетической рекомбинации, способствуя обмену участками между соседними хромосомами. При повреждении ДНК Rec A разрушает белок-репрессор, который в норме подавляет транскрипцию всей совокупности генов SOS-ответа. Данные по мутантным бактериям, лишенным различных компонентов SOS-ответа, указывают, что новосинтезированные белки могут действовать двумя путями. Первый — индукция синтеза новых ферментов репарации ДНК, что, как и ожидалось, способствует выживанию клеток. (Если мутантов по этим белкам подвергнуть ультрафиолетовому облучению, которое, как известно, повреждает ДНК, то гибнет большинство бактерий.) Второй путь — увеличивая количество ошибок при копировании



последовательностей ДНК, некоторые из индуцированных белков повышают скорость мутаций и, соответственно, генетическую вариабельность популяции. Этот путь не имеет отношения к кратковременному повышению выживаемости, но он может быть выгодным потому, что увеличивает шансы появления мутантных клеток с повышенной устойчивостью к действию агента.

Надежность организации биологических систем проявляется не только на молекулярном уровне. Так, у многоклеточных организмов надежность функционирования обновляющихся и растущих тканей осуществляется за счет определенного резерва покоящихся клеток, вышедших из митотического цикла и менее подверженных различным воздействиям, чем активно делящиеся клетки. Кроме того, клетки, находящиеся в разных фазах клеточного цикла, различаются устойчивостью к повреждению. К этой же категории механизмов обеспечения надежности относится существование в таких системах, как печень и мезотелий, большого количества двуядерных клеток. В случае повреждения и необходимости быстро восполнить клеточный фонд ткани вначале происходит цитотомия двуядерных клеток, затем в фазу  $G_1$  вступают клетки, находящиеся в периоде покоя  $G_0$ , а потом уже идет обычный митотический цикл. То есть в этом случае гарантией надежности системы на уровне ткани является асинхронность клеточных популяций и особая организация клеточного цикла.

Еще одним механизмом обеспечения устойчивости клеточной популяции к действию внешних агентов может быть генетическая неидентичность клеток. Так, например, при селекции клеток на устойчивость к яду метатрексату было получено несколько линий клеток, во много раз (до нескольких тысяч) более устойчивых к действию яда, чем исходный клон. Оказалось, что высокая резистентность связана с амплификацией (200-кратной) гена дигидрофолатредуктазы (ДГФР). Исследование клонов разной степени устойчивости и закономерностей их роста на среде с метатрексатом показало, что исходная популяция клеток гетерогенна по количеству генов ДГФР на гаплоидный геном. В норме селективным преимуществом обладают клетки с низким содержанием генов ДГФР, скорость деления которых выше. На среде с метатрексатом положение меняется. В данном случае мы сталкиваемся с феноменом возрастания надежности клеточной популяции путем повышения ее гетерогенности.

Механизмы резистентности клеток к действию ядов были детально изучены при исследовании широко известного в медицине явления — устойчивости к поливалентной химиотерапии при раке. Достаточно давно было установлено, что практически для каждого класса противораковых препаратов можно экспериментально получить опухоли, устойчивые к лекарственному препарату данного типа. Природа устойчивости такова:



в любой клеточной популяции появляются мутантные клетки, устойчивые к данному лекарственному препарату. Обнаруживаемая при ранней диагностике опухоль уже содержит сотни миллионов клеток и некоторые из них с большой степенью вероятности окажутся устойчивыми к лекарствам. Лечение такой опухоли каким-то одним препаратом приведет к гибели всех чувствительных клеток, но устойчивые будут размножаться и в результате возникнет другая опухоль. Попытка лечить опухоли сразу несколькими препаратами, т. е. поливалентная терапия, в ряде случаев успеха не имела. При исследовании этого феномена и было обнаружено существование клеток, обладающих множественной устойчивостью к химиотерапии.

Еще в ранних работах по химиотерапии опухолей у мыши выяснилось, что повышение устойчивости к одному лекарственному препарату может сопровождаться одновременным повышением устойчивости к ряду других, причем часто совершенно неродственных. Независимо проведенные генетические работы показали, что множественная лекарственная устойчивость возникает в результате мутации всего одного гена. Это и объясняет неудачи поливалентной химиотерапии — единичная мутация вызывает устойчивость к спектру неродственных лекарств. В дальнейших экспериментах выяснилось, что клетки, устойчивые к данному препарату, обладают способностью освобождаться от него, т. е. быстро выводить его из клетки. В плазматической мембране таких клеток присутствует активно действующий насос, выводящий из клетки проникшее в нее лекарственное вещество. Такое же явление имело место в клетках, устойчивых к метатрексату. Активная природа насоса была доказана в опытах по ингибированию энергетики цианидами — при этом устойчивая клетка начинала вести себя как чувствительная. Если цианид отмыть, то клетка восстанавливает способность «выбрасывать» лекарственное вещество. Затем из мембран устойчивых клеток был выделен специфический гликопротеин молекулярной массой около 170 кДа. Его называли гликопротеин Р — от permeability — проницаемость. Присутствие этого гликопротеина было доказано с помощью моноклональных антител для клеточных линий млекопитающих разных видов. Во всех устойчивых клетках содержание гликопротеина Р коррелировало со степенью устойчивости к лекарственным препаратам. Методами молекулярной гибридизации удалось показать, что содержание гликопротеина Р в клетках с множественной лекарственной устойчивостью связано с амплификацией соответствующего гена. В таких клетках может быть до 60 копий гена гликопротеина Р. Наконец, прямое доказательство связи гликопротеина Р с феноменом лекарственной устойчивости было получено следующим образом: из мышинных клеток, устойчивых к лекарствам, выделили фрагмент ДНК, содержащий последовательность, кодирующую гликопротеин Р, и ввели его в клетку хомячка, чув-



ствительную к лекарствам. Потомки этой клетки выращивались на среде с лекарствами и оказались устойчивыми к ним. В ДНК этих клеток оказалось множество копий мышинового гена гликопротеина Р. Приобретенная устойчивость зависела от экспрессии этого гена; содержащие его клетки имели высокую перекрестную устойчивость.

В последующих экспериментах определили аминокислотную последовательность гликопротеина Р путем секвенирования ДНК. Оказалось, что это молекула, у которой обе половины аминокислотной цепи очень похожи друг на друга. По-видимому, предковый ген этого белка когда-то претерпел дупликацию и возник тандемный повтор. В белковой цепи имеется двенадцать последовательностей гидрофобных аминокислот; молекула гликопротеина Р может 12 раз пронизывать мембрану (рис. 107).

Как указывалось выше, такая конфигурация характерна для мембранных белков, участвующих в транспортных процессах. По-видимому 12 трансмембранных участков гликопротеина Р образуют пору в мембране; N-концевая надмембранная часть молекулы экранирована углеводными остатками. В цитоплазму выступают два больших гомологичных гидрофильных С-концевых домена, содержащих участки связывания АТФ. Это соответствует данным о энергозависимости процесса выведения из клетки лекарственных препаратов.

Интересно отметить, что в норме у человека и высших млекопитающих гликопротеин Р обнаруживается в мембранах апикальных частей эпителиальных клеток почек, надпочечников, печени и некоторых отделов желудочно-кишечного тракта. Все эти ткани участвуют в транспорте веществ, а некоторые — в процессах детоксикации. В таких тканях часто возникают опухоли с врожденной устойчивостью к лекарствам — возможно, что происходящее в норме образование в этих тканях гликопротеина Р сохраняется и в зарождающихся раковых клетках. По-видимому, в норме гликопротеин Р так или иначе участвует в процессах трансмембранного транспорта.

Подобные системы резистентности свойственны не только клеткам млекопитающих. У бактерий, например, существуют высокоспециализированные механизмы, обеспечивающие устойчивость клеток к вредным воздействиям. Так в плазматической мембране бактериальных клеток присутствуют АТФазы, отвечающие за выведение из клетки ионов тяжелых металлов, оказывающих токсическое действие.

Существует значительная гомология между бактериальными АТФазами и гликопротеином Р. Гомологичные районы полипептидов занимают до 250 аминокислот; в некоторых случаях обнаруживаются до 30% идентичных аминокислотных остатков. Имеется также сходство структурной организации АТФаз, обеспечивающих удаление вредных веществ и гликопротеина Р. Некоторые бактериальные АТФазы также имеют 12 трансмем-



бранных доменов и два гидрофильных АТФ-связывающих участка.

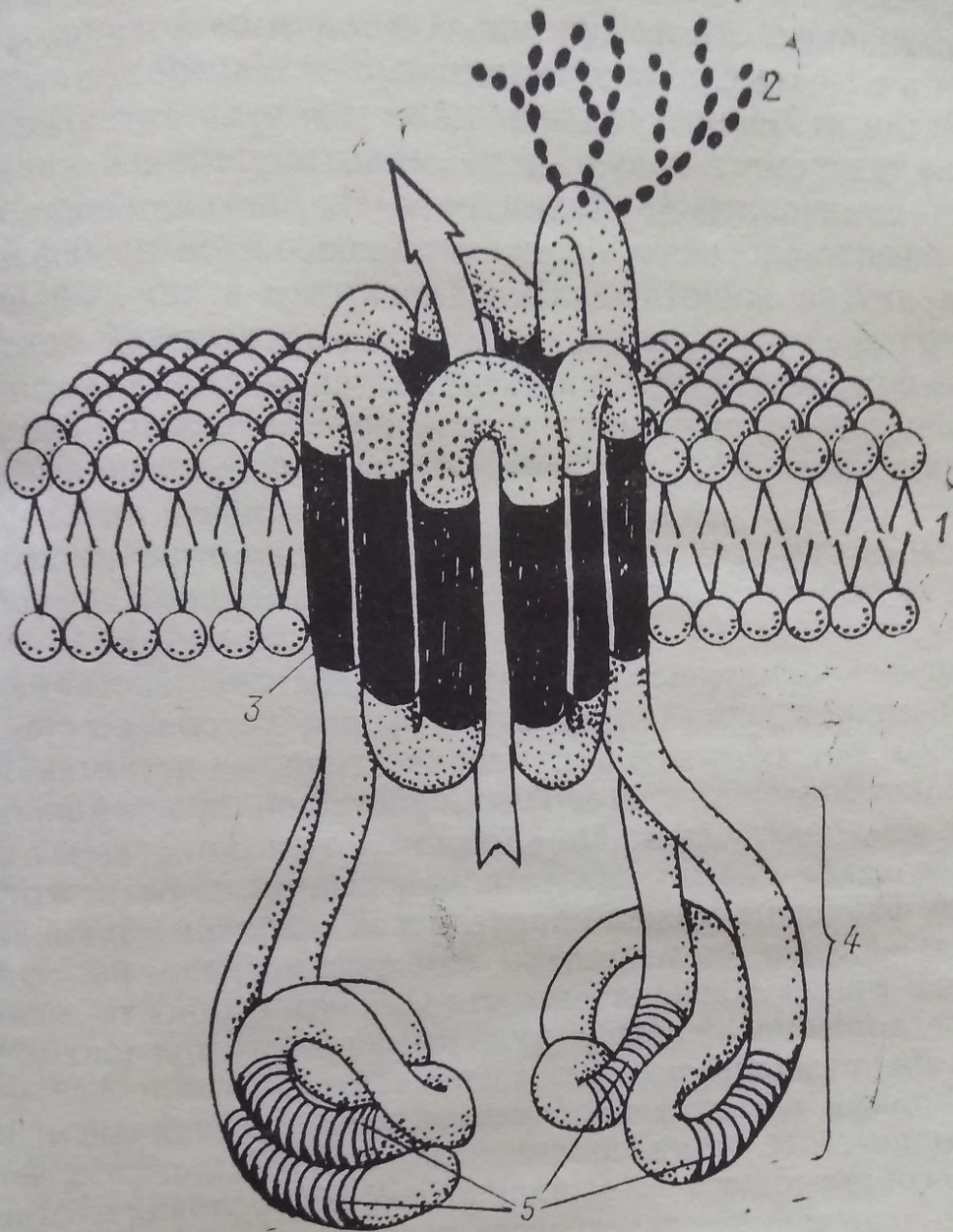


Рис. 107. Структура гликопротеина Р.

1 — мембрана; 2 — углеводные остатки; 3 —  $\alpha$ -спиральные участки; 4 — цитоплазматический домен с АТФ-связывающими участками (5).

Широкая гомология выявляется при сопоставлении гликопротеина Р с транспортными белками ряда организмов; наиболее консервативным у этих белков оказывается цитоплазматический АТФ-связывающий домен.

Отбор генотипов, устойчивых к данному воздействию, лежит в основе так называемых генетических адаптаций. Они происходят за счет естественного отбора форм с генотипом, способствующим выживанию особи в новых условиях, тогда как остальные представители данной популяции гибнут. Ведь особи генетически разнородны, и устойчивость их к разным факторам среды определяется генотипически. Так, например, у шести видов



дрозофилы обнаружена разная чувствительность к  $\alpha$ -аманитину — грибному яду, причем чувствительными оказались виды, редко развивающиеся на грибах, а виды-микофаги не реагировали на яд в той же концентрации, добавленный к питательной среде. Путем селекции удалось даже из чувствительного вида выделить нечувствительную к  $\alpha$ -аманитину линию, у которой оказалась изменена РНК-полимераза II. Австралийские кустарниковые крысы способны переносить дозы ядов в 30 раз большие, чем другие животные. Оказалось, что в тех районах, где они обитают, есть растения, содержащие в высокой концентрации яд — фторацетат натрия; эти растения, как правило, не употребляются животными в пищу, но у кустарниковых крыс составляют около 10% рациона. Среди микроорганизмов есть виды, приспособившиеся к жизни при очень высоких концентрациях солей в окружающей среде, при температуре выше 100°C или при постоянном облучении в дозах, измеряемых миллионами рентген.

Интересно отметить, что при воздействии экстремальных факторов может происходить отбор форм, устойчивых сразу к нескольким факторам. Такая перекрестная резистентность обнаружена у бактерий, водорослей, растений, простейших, дрозофил и млекопитающих. По-видимому, при этом имеет место неспецифическое повышение устойчивости, т. е. резистентность к разным факторам может определяться общими механизмами. Подобное явление было только что рассмотрено на примере клеточных линий млекопитающих. Однако сущность механизмов, определяющих перекрестную устойчивость организмов, остается в значительной мере невыясненной.

Необходимо еще раз подчеркнуть, что адаптивные изменения, передаваемые по наследству и основанные на отборе генотипа, способствующего выживанию в новых условиях, относятся к так называемым генетическим или генотипическим адаптациям.

Кроме них существует целый комплекс адаптивных механизмов, отвечающих за приспособление организма к изменяющимся условиям в течение жизни и не передаваемых по наследству — так называемых фенотипических или физиологических адаптаций. Они определяются способностью данного генотипа формировать в зависимости от окружающей среды разный фенотип, т. е. нормой реакции. Таким образом, амплитуда фенотипических преобразований определяется генотипически.

Итак, адаптация к внешним воздействиям представляет собой комплекс реакций, реализующихся на разных уровнях биологической интеграции — от молекулярного и клеточного до организменного и популяционного. Наибольший интерес в обсуждаемом аспекте представляет клеточный уровень обеспечения адаптивных процессов. Мы уже видели, что факторы внешней среды влияют на генетический аппарат клетки, вызывая раз-



личные нарушения (от кратковременного обратимого изменения его функциональной активности до необратимой деструкции). Изменения метаболизма клетки происходят и на других уровнях ее организации — внешнее воздействие может затронуть процессы трансляции или изменить спектр посттрансляционных модификаций полипептидных цепей. Так, у генотипически одинаковых особей обнаруживаются различные изоферменты, активность которых проявляется по-разному в зависимости от условий окружающей среды.

Классическим примером такого рода адаптивных приспособлений служит фермент лактатдегидрогеназа, отвечающая за превращения молочной кислоты. Она состоит из полипептидных цепей двух типов — М и Н, которые контролируются двумя разными генами. Молекула фермента содержит четыре цепи, причем во всех возможных сочетаниях. Легко убедиться, что таких сочетаний может быть пять: МННН, ММНН, МММН, ММММ, НННН. Взаимное расположение цепей в молекуле тоже сказывается на свойствах фермента. В разных условиях функционируют различные изоформы лактатдегидрогеназы, лучше приспособленные к данным конкретным условиям. Так, при температурной адаптации серебряного карася общая активность и спектр изоферментов лактатдегидрогеназы в его печени изменяются в соответствии с температурой среды, обеспечивая тем самым существование животных в новых условиях. Показана также различная чувствительность субъединиц М и Н и образованных ими комплексов к неорганическим ионам, в частности к ионам Na, K и Cl; оказалось, что у морских моллюсков и ракообразных при изменении солености воды происходят изменения спектра изоферментов лактатдегидрогеназы. Интересно отметить, что изозимы лактатдегидрогеназы, относящиеся к М-типу, функционируют преимущественно в условиях дефицита кислорода.

Еще одним примером адаптивных изменений ранга фенотипических адаптаций могут служить упоминавшиеся в разделе, посвященном организации мембран, изменения соотношения насыщенных и ненасыщенных мембранных липидов в клетках пойкилотермных животных при сдвигах значений температуры окружающей среды.

Однако по изученности механизмов, обеспечивающих адаптивные реакции, пожалуй, наиболее удачным примером будет явление осмотической толерантности у бактерий.

Несколько солеустойчивых видов микроорганизмов, например из рода *Halobacterium*, приспособились к жизни при высокой концентрации солей в среде и поддерживают высокие значения ионной силы в клетке. У этих видов внутриклеточные ферменты эволюционировали таким образом, что обрели устойчивость к денатурирующему действию этого фактора. Однако большинство видов обычно существует при низкой или средней



осмолярности среды. Эти виды поддерживают относительно низкую концентрацию ионов в цитоплазме и соответственно их ферменты достаточно чувствительны к повышению ионной силы в клетке. Такие виды выработали механизмы, благодаря которым они могут адаптироваться и выживать в условиях флуктуирующей осмолярности внешней среды. Исследования, выполненные на *E. coli* и других бактериях, показали, что за осмотическую адаптацию отвечает очень небольшое количество генов. Их активность регулируется либо на уровне транскрипции, либо путем изменения активности их белковых продуктов; это позволяет получить интегративный ответ, обеспечивающий клетке возможность существовать в широком диапазоне соленостей внешней среды. При этом осмотическое давление внутри клетки регулируется за счет повышения или понижения содержания каких-либо низкомолекулярных соединений или ионов; такие вещества обычно называют осмотически активными агентами или осмотическими эффекторами. Основным осмотически активным агентом для многих видов микроорганизмов является  $K^+$ . Его накопление позволяет сбалансировать внешнюю осмолярность и поддерживать клеточный тургор. Грубо говоря, концентрация  $K^+$  в клетке возрастает пропорционально осмолярности внешней среды. При этом изменяется соотношение поглощения  $K^+$  и его выведения из клетки. У *E. coli* действуют две системы поглощения  $K^+$ : постоянно функционирующая (конститутивная) с низким сродством к  $K^+$  и система с высоким сродством к  $K^+$ , которая запускается действием осмотического стресса. Последняя кодируется опероном *kdpABC*, содержащим три структурных и два регуляторных гена. Продукты этих генов регулируют экспрессию оперона *kdpABC* в ответ на осмотический стресс. Повышение осмолярности среды вначале вызывает выход воды из клетки, что значительно снижает тургор. Это немедленно индуцирует экспрессию оперона *kdpABC* и происходит накопление  $K^+$  до тех пор, пока не восстановится тургор, что в свою очередь вызывает репрессию оперона. Однако слишком большое накопление  $K^+$  в клетке может привести к ингибированию внутриклеточных ферментов; поэтому в условиях повышенной солености среды определенное преимущество будут иметь клетки, которые могут этого избежать, используя в качестве осмотического эффектора какие-либо другие соединения, не оказывающие столь разрушительного влияния на функцию клеточных ферментов. Многие организмы, включая цианобактерий, энтеробактерий, морских беспозвоночных и высшие растения, пользуются такой же стратегией при решении подобных проблем: они накапливают вместо  $K^+$  вещества, более соответствующие стоящей перед ними задаче — возможности аккумулировать это вещество в больших концентрациях, но с минимальным повреждающим воздействием на нормальный метаболизм и функционирование ферментов. Таких веществ доста-



точно много; разные виды предпочитают разные вещества. Сюда входят сахара, многоатомные спирты, аминокислоты. Наиболее распространенные в этом смысле соединения — аминокислоты бетаин и пролин. Защитный эффект бетаина демонстрируется в следующих опытах. NaCl в определенной концентрации блокирует рост *E. coli*, но если к среде добавить бетаин, то рост бактерий будет нормальным. Подобным же образом NaCl оказывает ингибирующее действие на активность малатдегидрогеназы *in vitro*, при добавлении же небольших количеств бетаина ее активность в условиях высокой ионной силы полностью восстанавливается.

Поглощение бетаина у *E. coli* осуществляется разными транспортными системами с низким и высоким сродством к бетаину. Синтез второй системы индуцируется только в том случае, если клетки растут в условиях высокой осмолярности, причем экспрессия гена, кодирующего эту систему, непосредственно связана с накоплением в цитоплазме  $K^+$ . Такая зависимость соответствует разной физиологической роли этих двух осмотически активных соединений. Как указывалось выше, при повышении осмолярности внешней среды индуцируется экспрессия оперона *kdrABC*, в результате чего  $K^+$  поглощается клеткой до тех пор, пока не восстановится тургор. Однако, если повышение осмолярности достигает значительной величины, то количество  $K^+$ , как мы уже говорили, может дойти до уровня, опасного для деятельности внутриклеточных ферментов; при достижении определенной концентрации  $K^+$  внутри клетки индуцируется экспрессия гена, включающего систему транспорта бетаина, который и накапливается в клетке вместо  $K^+$ . Кроме поглощения бетаина из внешней среды некоторые линии *E. coli* способны синтезировать его из внутриклеточного холина. Ферменты, обеспечивающие эти превращения, присутствуют только в клетках, подвергшихся осмотическому стрессу; весьма вероятно, что индукция такого ответа тоже происходит на уровне транскрипции.

Итак, у бактерий имеются гены, работа которых непосредственно регулируется уровнем осмолярности — их транскрипция подавляется в отсутствие осмотического стресса и индуцируется повышением осмотического давления. Экспрессия некоторых других генов также зависит от изменения осмолярности среды, например, генов, кодирующих белки-порины внешней мембраны. Однако здесь этот эффект носит скорее всего косвенный характер и, кроме того, эти гены отвечают также на изменение других факторов — температуры, pH, химического состава среды.

При осмотическом стрессе происходят и другие изменения метаболизма бактерий: например, синтезируется глутамат, который требуется для поддержания баланса зарядов при накоплении положительно заряженного K. Фермент, определяющий



скорость биосинтеза глутамата — глутаматдегидрогеназа — всегда присутствует в клетке, но ее активность может возрасти на порядок при повышении концентрации  $K^+$ . Интересно отметить, что глутаматдегидрогеназа и глутаминовая кислота играют важную роль в поддержании осмотического баланса клеток морских беспозвоночных, которые используют в качестве осмотических эффекторов именно аминокислоты.

Явление изменения концентрации свободных аминокислот в клетках при изменении осмолярности внешней среды носит название внутриклеточной изоосмотической регуляции и является одним из важных механизмов соленостной адаптации. Концентрация неорганических ионов в клетке, меняясь вслед за соответствующими изменениями в среде, модифицирует активность ряда ферментов, ответственных за синтез аминокислот и в первую очередь глутаматдегидрогеназы. Например, в ответ на повышение концентрации солей в среде активируется биосинтез глутамата, что в свою очередь приводит к образованию аланина, пролина и глицина, ибо глутамат служит донором аминок групп при биосинтезе этих аминокислот. Повышение концентрации этих аминокислот, а также бетаина и таурина — продукта декарбоксилирования цистеиновой кислоты, составляющего у моллюсков примерно половину внутриклеточного пула низкомолекулярных азотсодержащих соединений — приводит к повышению осмотического давления в клетке.

Свободные аминокислоты принимают участие в регуляции объема клеток при изменениях солености среды у различных морских беспозвоночных — инфузорий, кишечнополостных, сипункулид, полихет, иглокожих, моллюсков и ракообразных. Однако, если у одних животных — например, ракообразных — основным путем регуляции содержания свободных аминокислот служат изменения их биосинтеза, то у других беспозвоночных они будут играть второстепенную роль и на первый план выступают другие механизмы — скажем, процессы трансмембранного переноса аминокислот у моллюсков; при повышении солености среды происходит поглощение аминокислот из внешней среды, особенно значительное в жабрах, а при снижении осмолярности — экскреция их в гемолимфу, где аминокислоты подвергаются дезаминированию и дальнейшей деградации.

Интересно отметить, что внутриклеточная изоосмотическая аминокислотная регуляция является автономной и проявляется у изолированных клеток.

Однако, как мы видели выше, помимо аминокислот существуют и другие осмотические эффекторы. Клетки растений, например, в подобных случаях предпочитают использовать сахара и многоатомные спирты, а морские моллюски, не отказываясь от аминокислот, противостоят осмотическому стрессу и с помощью изменения содержания неорганических ионов в



клетках, таким образом в значительной степени компенсируя изменения внутриклеточной осмолярности, вызванные сдвигами осмотического давления во внешней среде.

Так, одним из основных осмотических эффекторов в клетках морских моллюсков является  $\text{Na}^+$ , при этом содержание  $\text{K}^+$  меняется очень мало. Оказалось, что у морских моллюсков помимо  $\text{K}$ ,  $\text{Na}$ -АТФазы в плазматической мембране существует еще один насос, транспортирующий  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$ . Этот насос функционирует в зависимости от осмолярности среды, не работая при повышении солености и активно удаляя ионы  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  из клетки при снижении осмотического давления. Подобный насос существует также в клетках почки позвоночных животных.

Итак, в качестве стратегии адаптации к осмотическому стрессу филогенетически отдаленные виды при разных вариантах используемых веществ следуют общему принципу — компенсации сдвигов осмолярности и поддержания осмотического баланса за счет изменения содержания осмотически активных соединений, то есть используют альтернативные пути в рамках решения единой задачи, таким образом повышая надежность системы.

Еще более отчетливо этот принцип прослеживается при анализе феномена теплового шока, привлечшего в последнее время пристальное внимание многочисленных исследователей.

Уже в 1962 году итальянец Ритосса обнаружил, что если поместить личинку дрозофилы или ее изолированные слюнные железы в условия повышенной температуры ( $37^\circ\text{C}$  вместо обычных для них  $25^\circ\text{C}$ ), то в нескольких немногих локусах полигенных хромосом образуются новые пuffs. Через некоторое время они достигают максимальных размеров, затем медленно регрессируют. Если же снизить температуру до нормальной, то регрессия пuffs происходит значительно быстрее. Это наблюдение повлекло за собой интенсивное изучение хромосомной локализации и структурной организации генов, отвечающих на температурное воздействие и названных генами теплового шока, а также исследование синтеза РНК и белков, появляющихся в клетках при тепловом шоке.

В активированных повышением температуры локусах происходит синтез новых РНК, которые затем транслируются в цитоплазме с образованием белков теплового шока (БТШ). Синтез большинства типов старых информационных РНК прекращается, соответственно подавляется и синтез большинства старых белков. Разрушаются и предсуществующие в клетке полисомы и через некоторое время образуются новые, на которых и происходит трансляция белков теплового шока.

В клетках дрозофил образуются БТШ с молекулярной массой 82, 70, 68, 36, 27, 26, 23 и 22 кДа. Белки эти принято обозначать следующим образом: БТШ-82, БТШ-70 и т. д. Синтез всех восьми БТШ начинается у дрозофилы уже через 10 мин



после повышения температуры и максимальная скорость синтеза достигается через 90—120 мин. Затем происходит постепенное снижение скорости синтеза БТШ и через 6—8 часов она падает вдвое. Если же клетки перенести в нормальные условия, то интенсивность синтеза БТШ падает значительно быстрее. Таким образом, клетки реагируют на повышение температуры очень быстро — хромосомные локусы активируются уже в течение первой минуты воздействия, а новосинтезированные БТШ обнаруживаются через 10 мин.

Дальнейшие исследования показали, что подобный ответ на температурное воздействие характерен не только для дрозофилы, но и для всех изученных организмов, как бы далеко в филогенетическом отношении они ни отстояли друг от друга. Недавно один из обзоров на эту тему получил название «Тепловой шок — от бактерий до человека». Более того, оказалось, что такие белки синтезируются в ответ и на другие повреждающие воздействия — такие как кислородное голодание, различные химические агенты, некоторые вирусы и другие стрессовые воздействия; поэтому их называют еще стрессовыми белками.

Данные по секвенированию ДНК этих белков показали, что существует по крайней мере три основных семейства стрессовых белков с молекулярной массой 80—90, 65—75 и 15—30 кДа. Наиболее консервативными являются белки двух первых семейств, они очень мало отличаются у *E. coli*, дрозофилы и человека. Гомология между БТШ-70 дрозофилы и человека составляет 73%, а моноклональные антитела против БТШ-70 дрозофилы взаимодействуют с БТШ-70 человека, морского ежа и цыпленка.

Синтез белков теплового шока имеет адаптивное значение, ибо позволяет приспособиться к неблагоприятным условиям; таким образом, изначально ясно, что они оказывают защитное действие на клетку. Однако вопрос о том, как они это делают, до сих пор далек от разрешения. Тем не менее в последнее время получены данные, позволяющие несколько прояснить положение.

Выяснено, что стрессовые белки в небольших количествах синтезируются и в нормальных условиях и являются необходимыми для обеспечения некоторых клеточных функций. Особый интерес в обсуждаемом аспекте представляют следующие функции: во-первых, участие белков теплового шока в снятии клатриновой оболочки с окаймленных пузырьков в процессе опосредованного рецепторами эндоцитоза, и, во-вторых, присутствие белков теплового шока в просвете эндоплазматического ретикулума.

Белок семейства БТШ-70, так называемая «раздевающая АТФаза», связывается с клатриновой оболочкой пузырька в присутствии АТФ и гидролизует молекулу АТФ, что приводит к



распаду связей клатриновых трискелионов между собой и вызывает диссоциацию оболочки (рис. 108).

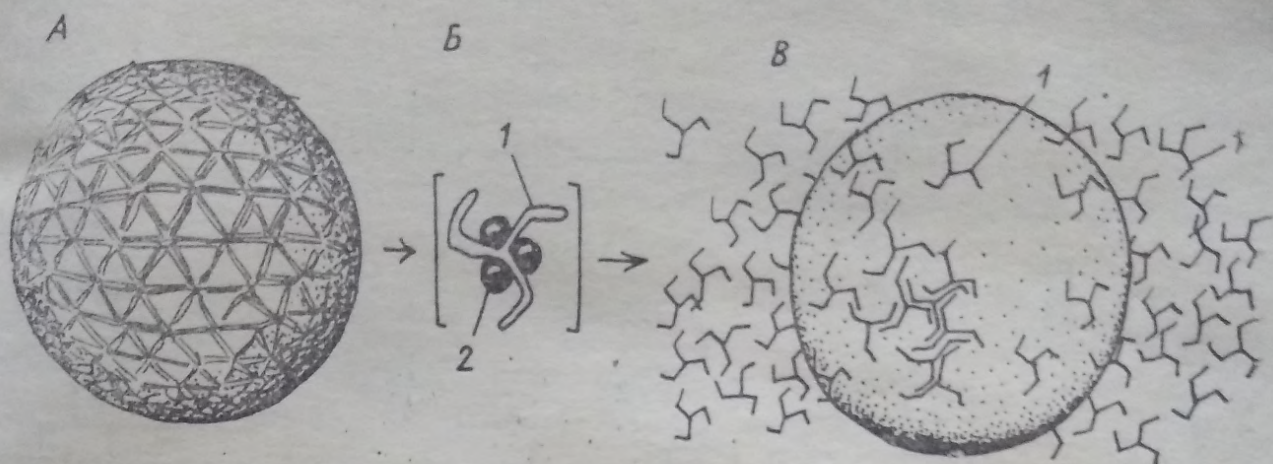


Рис. 108. Разборка клатриновой оболочки эндоцитозных пузырьков.

А — окаймленный пузырек, Б — комплекс клатринового трискелиона (1) с «раздевающей» АТФазой (2), В — пузырек в процессе разборки клатринового опушения.

На клетках млекопитающих показано, что при тепловом шоке белки семейства БТШ-70 мигрируют в ядро и связываются с ядерным матриксом; отмечается также накопление этих белков в ядрышке, где они связываются с предшественниками рибосом. Введение в клетки плазмиды с геном БТШ-70, приводящее к избыточной продукции этого белка, ускоряет репарацию клеток после теплового шока. Каков же механизм защитного действия БТШ? По предположениям ряда авторов, могут происходить следующие явления: во время теплового шока белки частично денатурируют, обнажая ранее защищенные гидрофобные области, которые взаимодействуют между собой, образуя нерастворимые агрегаты. Прочно связываясь с гидрофобными поверхностями таких белков, БТШ ограничивают их взаимодействия и способствуют диссоциации комплексов. Затем БТШ используют энергию гидролиза АТФ, для того чтобы отделиться от субстрата и при этом изменяют конформацию, что в свою очередь может вызвать конформационные изменения белка, связанного с БТШ-70, ослабляя его связи с другими белками. Освобожденный субстрат сможет восстановить нормальную конформацию. Многократное повторение этого процесса может привести к репарации и столь крупной структуры как ядрышко. (Схема цикла приведена на рис. 109.)

Эти предположения вполне согласуются со свойствами БТШ, которые проявляются при их функционировании в нормальных условиях — способностью связывать АТФ и тенденцией к взаимодействию с денатурированными или частично измененными белками. Как выяснилось недавно, БТШ способствуют сборке и правильной укладке некоторых белков, имеющих субъединичное строение. Так, при образовании основного белка фотосинтетического цикла хлоропластов — рибулезо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы — оксигеназы — последовательная сборка фермента из вось-



ми больших и восьми малых субъединиц обеспечивается деятельностью белка, относящегося к семейству БТШ (рис. 110). Такие же факты имеют место и у бактерий.

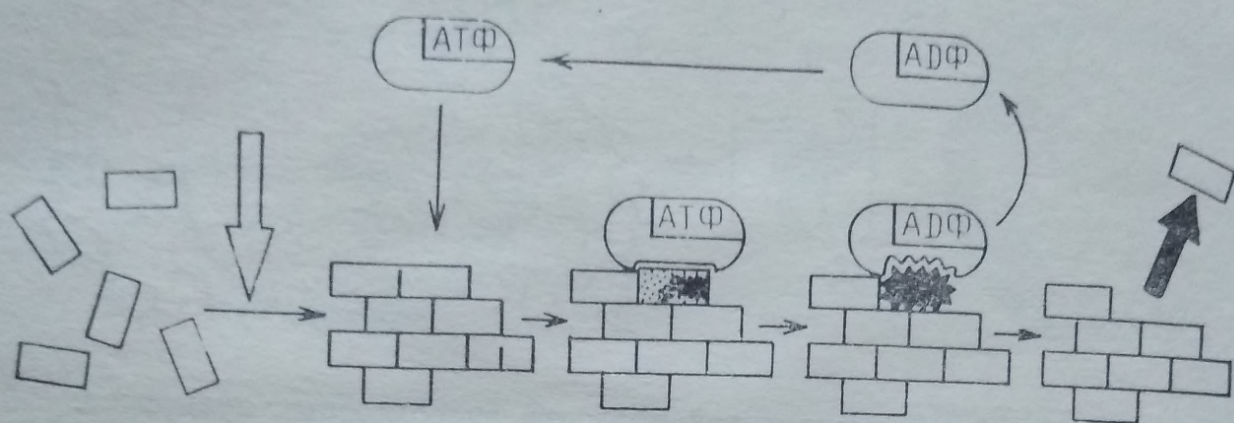


Рис. 109. Разборка агрегатов поврежденных белков с участием БТШ-70. Объяснения в тексте.

Особый интерес в данной ситуации вызывают события, происходящие в просвете эндоплазматической сети. Он заполнен только что синтезированными и находящимися в процессе синтеза белками, которые еще не завершили укладку; их гидрофобные области не полностью экранированы, а как известно, это приводит к их взаимодействию между собой и образованию

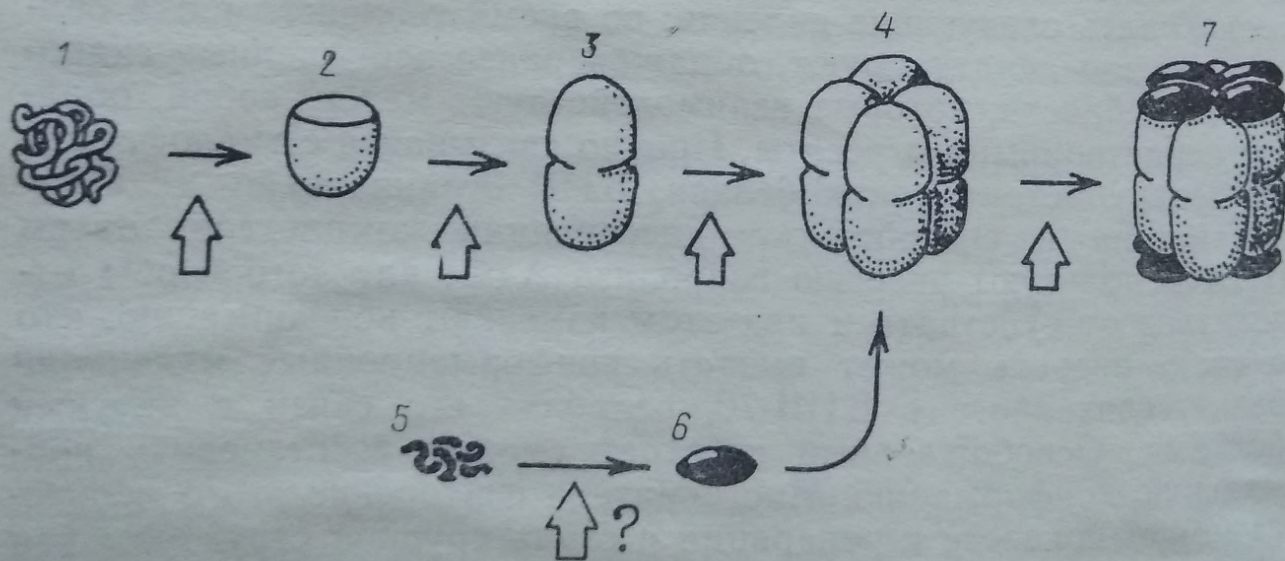


Рис. 110. Последовательные этапы сборки белка рибулезо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы — оксигеназы (Rubisco) с участием шаперонов.

1, 2 — мономер большой субъединицы в неупакованной (1) и упакованной (2) форме; 3 — димер; 4 — октамер; 5, 6 — мономер малой субъединицы в неупакованной (5) и упакованной (6) форме; 7 — зрелый белок Rubisco. Светлой стрелкой показано действие шаперонов.

белковых комплексов — агрегатов. Как упоминалось выше, в просвете эндоплазматической сети в больших концентрациях содержится так называемый Вир — полипептид, узнающий неправильно уложенные белки, ассоциируясь с их открытыми гидро-



фобными поверхностями. Связываясь с неправильно уложенными белками, Bp, во-первых, удерживает их в просвете ЭПС, не допуская перехода в аппарат Гольджи, а во-вторых, способствует правильной укладке. Оказалось, что этот белок связывает АТФ и относится к семейству БТШ-70.

Сходные белки существуют и в митохондриях, отвечая за правильную сборку субъединичных ферментов.

Наконец, совсем недавно была обнаружена еще одна функция белков семейства БТШ. Достаточно давно было известно, что многие белки попадают внутрь мембранных органоидов — таких как митохондрии, хлоропласты, эндоплазматическая сеть — посттрансляционно, то есть проходя через цитозоль и мембраны этих органоидов. Тонкие механизмы перехода белков через мембраны выяснены не были, существовали лишь предположения о том, что во время этого процесса глобулярная форма белков заменяется на фибриллярную, ибо довольно трудно представить себе переход через мембрану крупной гидрофильной молекулы глобулярной формы. Оказалось, что существуют специальные белки-шапероны (от англ. *chaperone* — компаньонка), которые обеспечивают разворачивание глобулярной молекулы и перенос ее в фибриллярной форме через мембраны соответствующих органоидов. Эти белки связывают АТФ и относятся к семейству БТШ (рис. 111).

Вся совокупность этих данных указывает на то, что предположения о механизме защитного действия стрессовых белков при повреждении не лишены основания. Однако точных и прямых доказательств этого пока получить не удалось и вполне возможно, что белки семейства БТШ готовят нам новые сюрпризы.

Система ответа на тепловой шок помимо чисто адаптивного значения интересна еще и тем, что представляет собой уникальную модель для изучения регуляции активности генов. Хорошо известно, что в отличие от прокариот регуляция эукариотических генов исследована значительно слабее. Это объясняется не только более сложным характером самой регуляции, но и тем, что существует очень мало простых модельных систем, доступных для экспериментального воздействия. В этом плане гены БТШ представляют собой очень большой интерес и в исследовании их регуляции достигнуты уже значительные успехи. Выяснена структура гена БТШ-70, определены регуляторные последовательности, установлено присутствие фактора регуляции. Так, оказалось, что белковый фактор HSTF присутствует в клетках, растущих в нормальных условиях, в неактивной форме. При тепловом шоке его количество возрастает в 5—7 раз; связываясь с определенной регуляторной областью, фактор HSTF при взаимодействии с РНК-полимеразой II вызывает усиленный синтез иРНК для БТШ-70.

Наконец, активно транскрибирующиеся в условиях теплового



го шока гены предоставляют уникальные возможности для изучения структуры активного хроматина и вопроса о наличии в нем нуклеосом — вопроса, дискутировавшегося до последнего времени. Именно на этих генах были проведены опыты по индукции образования сшивок между гистонами и ДНК, которые позволили сделать вывод об отсутствии нуклеосомной укладки

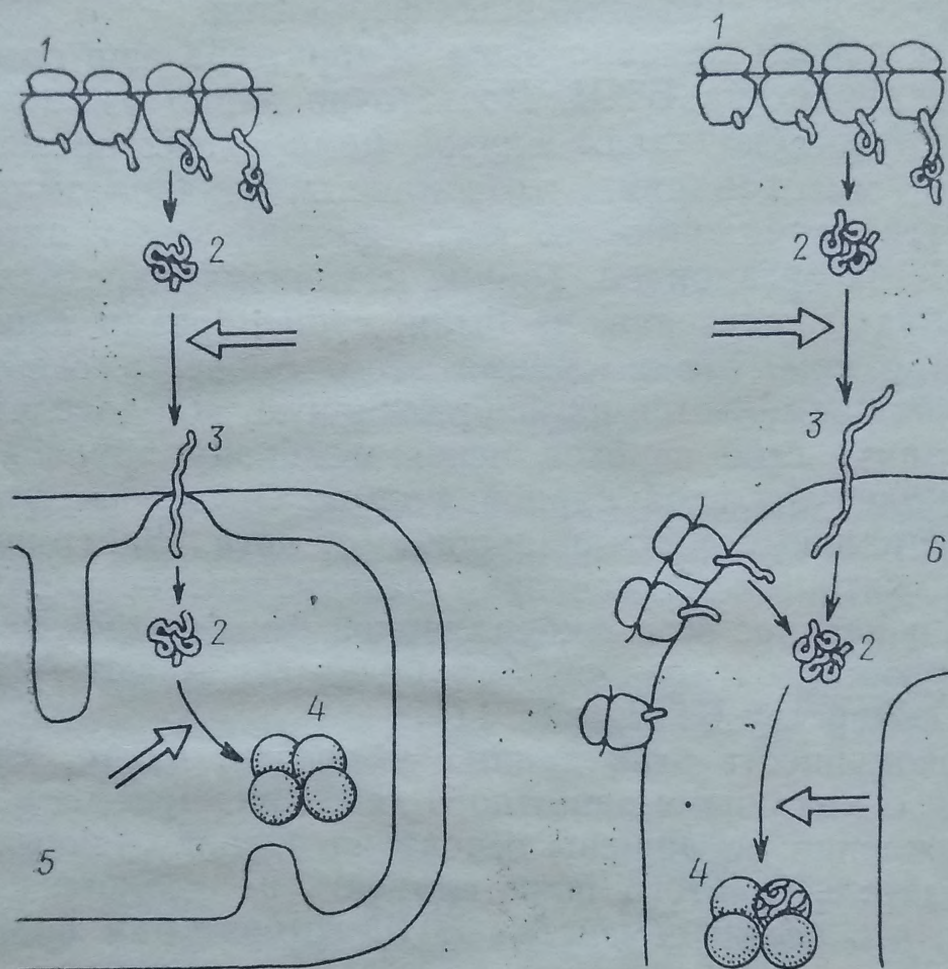


Рис. 111. Транслокация белков через мембраны клеточных компартментов с помощью шаперонов.

1 — рибосомы; 2—3 — полипептид в компактной (2) и расплетенной (3) форме; 4 — полипептид, упакованный в субъединицы; 5 — митохондрия; 6 — ЭПС. Светлые стрелки — см. рис. 110.

в районах активной транскрипции. На этих же генах установлено снижение содержания убиквитинированной формы гистона H2a в районах интенсивной транскрипции. Таким образом, система генов теплового шока является модельной системой, позволяющей найти ответы на вопросы, имеющие важнейшее значение для общей цитологии, генетики и молекулярной биологии. Исследовать регуляцию экспрессии генов БТШ необходимо на всех уровнях — транскрипции, процессинга и переноса транскриптов в форме зрелых иРНК в цитоплазму, трансляции — ведь необходимо выяснить, почему прекращается трансляция старых иРНК и т. д.; необходимо до конца прояснить функции белков теплового шока и то, каким образом они участвуют в регуляции активности генома.



Наконец присутствие системы ответа на тепловой шок у широчайшего круга объектов говорит об эволюционной древности этой системы; несомненное адаптивное значение ее позволяет подойти к проблеме эволюции адаптивных реакций, используя все достижения молекулярной биологии.

Изучение экспрессии генов ТШ в ответ на повреждение и анализ всех последующих событий и взаимодействий различных клеточных компонентов позволит выяснить вопрос о реакции на внешнее воздействие клетки как целостной системы, что безусловно обогатит наши понятия и об организации и функционировании клетки в норме.



Жадерта моголоосон ч  
гессогоосон ДВТУ

№ 14

## РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки. В 5 т. М., 1986.
- Аллен Р. Микротрубочка — внутренний мотор // В мире науки. 1987. № 4.
- Берридж М. Молекулярные основы внутриклеточных коммуникаций // В мире науки. 1985. № 12.
- Бретчер М. Как движется клетка животных // В мире науки. 1988. № 2.
- Введение в мембранологию / Под ред. А. А. Болдырева. М., 1990.
- Вебер К., Осборн М. Молекулы клеточного матрикса // В мире науки. 1985. № 12.
- Воробьев И. А., Надеждина Е. С. Центриольный аппарат и его роль в организации микротрубочек // Итоги науки и техники ВИНТИ. Сер. Общие проблемы физико-химической биологии. 1987. Т. 7.
- Георгиев Г. П. Гены высших организмов и их экспрессия. М., 1989.
- Глебов Р. Н. Эндоцитоз и экзоцитоз // Биохимия мембран. Книга 2. М., 1987.
- Де Дюв К. Путешествие в мир живой клетки. М., 1987.
- Збарский И. Б. Организация клеточного ядра. М., 1988.
- Збарский И. Б., Кузьмина С. Н. Скелетные структуры клеточного ядра. М., 1991.
- Инге-Вечтомов С. Г. Генетика с основами селекции. М., 1989.
- Кульберг А. Я. Рецепторы клеточных мембран // Биохимия мембран. Книга 4. М., 1987.
- Ленинджер А. Основы биохимии. В 3 т. М., 1985.
- Льюис Б. Гены. М., 1987.
- Макинтош Дж. Р., Макдональд К. Л. Митотическое веретено // В мире науки. 1989. № 12.
- Мюррей Э. У., Кишнер М. У. Чем регулируется клеточный цикл // В мире науки. 1991. № 5.
- Пташине М. Переключение генов. Регуляция генной активности и фаг  $\lambda$ . М., 1989.
- Расмусен Г. Циркуляция кальция и внутренняя передача внешних сигналов // В мире науки. 1989. № 12.
- Ротман Дж. Е. Как устроен аппарат Гольджи // В мире науки. 1985. № 11.
- Ротман Дж. Е., Ленард Дж. Мембранный транспорт в клетках животных // Перспективы биохимических исследований / Под ред. Дж. Туза и С. Прентиса. М., 1987.
- Рэфф Р., Кофмен Т. Эмбрионы, гены и эволюция. М., 1986.
- Серавин Л. Н. Происхождение эукариотной клетки // Цитология. 1986. Т. 28, № 6—9.



- Скулачев В. П. Биоэнергетика. Мембранные преобразователи энергии // Биохимия мембран. Книга 6. М., 1989.
- Снайдер С. Х. Молекулярные основы межклеточных коммуникаций // В мире науки. 1985. № 12.
- Спирин А. С. Молекулярная биология: Структура рибосомы и биосинтез белка. М., 1986.
- Структура и биосинтез нуклеиновых кислот // Молекулярная биология / Под ред. А. С. Спирина. М., 1990.
- Фултон А. Цитоскелет. Архитектура и хореография клетки. М., 1987.
- Хайнс Р. Фибронектины // В мире науки. 1986. № 8.
- Чек Т. РНК — фермент // В мире науки. 1987. № 1.
- Ченцов Ю. С. Общая цитология. М., 1984.
- Эдельман Д. Топобиология // В мире науки. 1989. № 7.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. Molecular Biology of the Cell. 1989.
- Attardi G., Schatz G. Biogenesis of Mitochondria // Ann. Rev. Cell Biol. 1988. Vol. 4.
- Bourne H. R. The GTPase superfamily // Nature. 1990. Vol. 348, N 6296.
- Bradshaw R. A. Protein translocation and turnover in eukaryotic cells / Trends Biochem. Sci. 1989. Vol. 14, N 7.
- Burridge K., Fath K., Kelley T., Nuckols G., Turner C. Focal adhesion: Transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton // Ann. Rev. Biochem. 1987. Vol. 56.
- Cantatore P., Saccone C. Organization, structure and evolution of mammalian mitochondrial genes // Intern. Rev. Cytol. 1987. Vol. 108.
- Cell and Molecular Biology of the Cytoskeleton / Ed. J. W. Shay. 1986.
- Fisher P. A. Chromosomes and chromatin structure: the extrachromosomal karyoskeleton // Curr. Opinion Cell Biol. 1989. Vol. 1.
- Gerace L. Functional organization of the nuclear envelope // Ann. Rev. Cell Biol. 1988. Vol. 4.
- Goldman M. A. The Chromatin Domain As a Unit of Gene Regulation // Bio-Essays. 1988. Vol. 9.
- Heath J. P., Holifield B. P. Cell locomotion: New research test old ideas on membrane and cytoskeletal flow // Cell Motil. Cytoskeleton. 1991. Vol. 18.
- Lysosomes: their role in protein breakdown / Ed. H. Glauman, F. John-Ballard. 1987.
- Mangeat P.-H. Interaction of biological membranes with the cytoskeletal framework of living cells // Biology of the Cell. 1988. Vol. 64.
- Mazia D. The Chromosome Cycle and the Centrosome Cycle in the Mitotic Cycle // Intern. Rev. Cytol. 1987. Vol. 100.
- McIntosh J. R., Koonce M. P. Mitosis // Science. 1989. Vol. 246.
- Mitosis: Molecules and Mechanisms // Ed. J. S. Hyams, B. R. Brinkley. 1989.
- Nigg E. Nuclear Function and Organization // Intern. Rev. Cytol. 1989. Vol. 110.
- Pelham H. Speculation on the function of the Major Heat Shock and Glucocorticoid regulated Protein // Cell. 1986. Vol. 46.
- Schliwa M. The Cytoskeleton // Cell Biology Monographs. 1986. Vol. 13.
- Steinert P. M., Roop D. R. Molecular and cellular biology of intermediate filaments // Ann. Rev. Biochem. 1988. Vol. 57.
- Small J. V. Microfilament-based motility in non-muscle cells // Curr. Opinion Cell Biol. 1989. Vol. 1.
- Zwieb C. Structure and function of signal recognition particle RNP // Progress in Nuclear Acid Research and Molecular Biology / Ed. W. Cohn, K. Moldave. 1989. Vol. 37.



## ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Адаптация 294, 300, 301, 304, 305  
 Аддуцин 41, 42  
 Аденилатциклаза 85  
 Актин 33—37, 39—43, 82, 206  
   —  $\alpha$ -33  
   —  $\beta$ -33, 206  
   —  $\gamma$ -33, 206  
   — глобулярный (G) 33—35, 206  
   — мышечный 33  
   — немышечный 33, 34  
   — фибриллярный (F) 33—36, 76, 262  
 $\alpha$ -Актинин 36, 37, 82  
 Актин-миозиновая система 36, 39, 50, 51, 94, 258  
 Акументин 34  
 Амебоциты 168, 169  
   — гранулярные 168  
   — крупногранулярные 169  
   — мелкогранулярные 169  
 Амилопласты *см.* Пластиды  
 Амплификация генов 238, 296, 297  
 Анафаза 242, 247, 253, 256  
   — А 60, 258  
   — Б 258  
 Анкирин 41, 43, 44, 57  
 Аппарат Гольджи 152—162, 166, 170, 178—190, 195  
   — пузырьки 153, 156  
   — трансраспределительный отдел, или распределительный отдел транс-части 162, 186, 187  
   — фибриллы 157  
   — цистерны 154, 156, 157, 159, 161  
   — цитозоль 153  
   — части (полюса) 154, 155, 161, 184, 185, 187, 189  
   — — средняя 154, 155, 161, 184, 185, 187  
   — — транс- 154, 155, 161, 184, 189  
   — — цис- 154—156, 161, 184, 185, 187  
 Асиалогликопротеины 82
- АТФ-синтаза *см.* Комплекс АТФ-синтазный  
 Са—АТФаза 151  
 К, Na-АТФаза 29, 136, 305  
 Аутофагия 169—171, 182  
 N-Ацетилглюкозамин 81, 146, 160, 161  
   — трансфераза 160, 161  
 Ацетилхолинэстераза 30
- Базальное тельце 52—54, 255  
 Базальный аппарат 53  
 Бактериородопсин 28, 134  
 Белки  
   — актинсвязывающие 34—36, 40  
   — Bd4,1 41  
   — Bd4,9 41  
   — Bip 147, 308, 309  
   — внутренние центромерные 272  
   — G вируса везикулярного стоматита (VSV) 161, 185, 186  
   — — ГТФ-связывающие 84—87  
   — гистоноподобные 215, 217  
   — HMG 211, 219  
   — HU1, HU2 215  
   — дополнительные клатринового опущения 91  
   — ДЦКД-связывающие 120, 121  
   — интегральные 22, 25  
   — кальцийсвязывающие 45, 94, 272  
   — cdc 2 *см.* Протеинкиназа p 34  
   — клеточной адгезии 76—80, 291  
   — липидтранспортирующие 126, 148  
   — MAP 50, 57, 60, 272  
   — метилакцептирующие хемотаксиса 73  
   — негистоновые 211  
   — нейрофиламентов 55  
   — периферические 22, 25  
   — причальные 144, 145  
   — промежуточных филаментов 55—57



- ResA 295
- FeS-содержащие 119
- серусодержащие 57
- sre 80
- SRP 147
- т 50, 91
- теплового шока (БТШ) 305—310
- холинрецептивные 30
- центромерные 272
- Бетаин 303
- Болезни накопления 171, 186

#### Вакуоль

- автофагическая 162, 166, 169, 170
- конденсационная 157, 180—182
- Вакуолярная Н<sup>+</sup>-АТФаза 164, 165
- Веретено центральное *см.* Митотическое веретено
- Виллин 34, 43
- Виментин 55, 57
- Винкулин 78, 80
- Воротничок 268, 269
- Вторичная лизосома 160, 161, 166

Галактозилтрансфераза 185, 186

Ганглиозиды 23, 65, 78

Гельзолин 34

Гетерофагия 165, 169, 171, 182

Гидрогеносомы 175, 176

Гидролазы 163, 165

Гистоны 192, 210—213, 219, 249

— H1 210, 212, 213, 219, 249

— H2A, H2, H3, H4 210, 212

Глиальный фибриллярный кислый белок (ГФКБ) — 55

Гликозилирование в

— аппарате Гольджи 158—160

— эндоплазматической сети 146

Гликозилтрансфераза 146

Гликокаликс 27, 64—67

Гликолипиды 23, 24, 65, 78

Гликопротеин Р 297—299

Bd3-Гликопротеин 27

Гликосомы 174

Гликофорин 41, 65

Глиоксисомы 175

Глутаматдегидрогеназа 304

— β-Глюкуронидаза 284—287

Гомеодомен 288

Гранулы

— интерхроматиновые 228, 229

— перихроматиновые 228

— секреторные 94, 156, 157, 170, 182, 184, 187

Грибовидные тела (тельца) 116, 118, 130, 135

Десмин 55, 57

Десмосома 97, 98

— поясковая (опоясывающая) 98

— септальная 98, 99

— точечная 97, 98

Диацилглицерол 85, 86

Дибифитанилглицерид 25

Дигидрофолатредуктаза (ДФГР) 296

Диктиосома 154

Динамин 50

Динамическая нестабильность микротрубочек 47, 48, 270

Динеин 50, 271

Динеиновые руки 51, 52, 54

Диольные липиды 24

Диффузия облегченная 28, 29

ДНК

— макси и мини кольца 122, 123, 217, 226

— митохондрий 122—124, 126, 127, 139, 217

— сателлитная 209

— хлоропластов 130—132, 140

— экстрахромосомальная 238, 240, 241

Долихолфосфат 145, 146

Дублеты микротрубочек 51, 52

Дыхательная цепь 113, 117, 118, 128, 133

#### Зоны

— слияния *см.* Контакты плотные

— прилегания *см.* Десмосомы опоясывающие

Иммуноглобулины 26, 280, 281, 287

Инозитолтрифосфат 85, 86, 150, 151

Интегрины, интегриновые рецепторы 77—80

Интроны 221—225

Информатин 227—229

Информосомы 228, 290

Информомеры 227—229, 290

N-Кадхерины 291

Кальмодулин 43, 44, 82, 83, 94, 272

Кальпактины 94

Кальсеквестрин 151

Кальциевые депо 150, 151

Кальцийсомы 150, 151

L-Каналы 136, 149—151

T-Каналы 149—151

Кардиолипиды 117, 119, 126, 135

Каталаза 173

Kdr ABC 302

Кератины 55, 57

Кинезин 50, 271, 272

Кинетопласт 122

Кинетопластиды 122, 217, 226

Кинетохор 249, 258, 270—272, 274—275

Кислая фосфатаза 154



Клатрин 90, 91, 182, 186, 189, 306, 307

Клеточный центр 255, 257  
— цикл 247, 248, 257

Колхицин 48, 49, 88, 94

Компартментализация 142, 162

Комплекс

— АТФ-синтазный ( $H^+$ -АТФ-синтаза) 118—120, 124, 128, 130, 131, 135

— поровый 193—195, 197, 198—201, 289, 290

— сахараза-изомальтазный 26, 27

— синаптонемальный 252

— соединительный 95—98

Компонент

— гранулярный 234—237

— фибриллярный 234—237

Конканавалин *см.* Лектин Con A

Коннексыны 99

Коннексоны 99

Коннектин *см.* Титин

Конститутивная секреция 94, 187

Контактные сайты 125

Контакты

— изолирующие 95, 96

— плотные 95

— фокальные 79, 80

Котрансляционная обработка белков 145

Кринофагия 170

Криптоген 226, 227

Кэпинг, кэпинг-эффект 82, 83, 100

Лактатдегидрогеназа 301

Ламеллоподии 75

Лamina *см.* Пластика плотная

Ламины 56, 202—204, 249

— А 202—204

— В 202—204

— С 202—204

Лейкопласты *см.* Пластиды

Лектины 80—84, 199, 200

— ФГА (фитогемагглютинин) 80, 81

— Con A (конканавалин) 81, 83, 84

— WGA 81, 199, 200

Лизосомы 163—173, 182, 184, 186—189

Липополисахариды 25, 62—64, 169

Липопротейны 25, 63, 64

— низкой плотности (ЛНП) 90, 188, 189

Макропиноцитоз 87, 88

Макрофаги 168

Малигнизация 72, 79

Маннозидаза I и II 160, 161

Матрикс

— интерхроматиновый 205, 206, 229, 246, 251

— ядерный 193, 197, 205, 206, 213, 214, 217, 229, 246, 288—290

— ядрышка 206, 235, 236

Матураза 224

Меромиозин тяжелый 37, 46

Метафаза 242, 246, 247, 253

Микоплазмы деление 262, 265

Микропероксисомы 173

Микропиноцитоз (транскитоз) 87, 89

Микротельца 173

Микротрубочки

— веретена 257—276

— — астральные (нити сияния) 256, 257

— — кинетохорные 257—276

— — полюсные 257

— цитоплазматические 45—54, 60, 71, 79, 94, 165, 258

Микротрубочкоорганизующий центр (МТОЦ, или ЦОМТ) 46, 47, 259, 260, 266—275

Микрофаги 168

Микрофибриллы (микрофиламенты)

— актиновые 32—40, 42, 60, 79, 258

— скелетные 10нм *см.* Фибриллы 10нм

Миозин 34, 36—39

— мышечный 38, 39

— немышечный 34, 36, 38, 39

— I (одноголовый миозин) 38, 39, 42

Мионемы 59

Митоз

— гипермастигид 264, 274, 275

— диатомовых водорослей 264, 266—269

— динофлагеллят 275, 276

— дрожжей 273

Митотический цикл 242—244, 246—249

Митотическое веретено 257—276

Митохондрии 133—128, 130—141, 217, 309

— генетический код 126

— геном 126—128, 139, 217

— — расточительный 127

— — экономный 126, 127

— гигантские 114

Митохондриальная сеть 114

Модель

— бусинок на нитке (нуклеосомная) 212

— бутербродная (сэндвича) 19—21

— жидкостно-мозаичная 21—23, 31

— липопротейнового коврика 21

MPF 248

Нексин 52

Нити

— натяжения *см.* Стресс-фибриллы

— сияния *см.* Микротрубочки астральные



Нуклеолин 236  
 Нуклеолонемное ядрышко см. Яд-  
 рышко нуклеолонемное  
 Нуклеомер (супербид) 213, 214  
 Нуклеоплазмин 199—201, 219  
 Нуклеопорины 199  
 Нуклеосома 212—214  
 — коровая 212  
 — полная 212  
 Окаймленные пузырьки 89—91, 182,  
 186, 187, 189  
 — ямки 89—91, 182, 188  
 Окислительное фосфорилирование  
 113, 117, 118, 132, 134—137  
 Околяядрышковый гетерохроматин  
 193, 233  
 Оридгин репликации 245, 246, 289  
 Ортомитоз 260  
 OSCP 120  
 Основания липофильные 163  
 Остаточное тело (тельце) 166  
 SOS-Ответ 295  
 Пероксисомы 173—175  
 Пинокситоз 87, 88  
 Пищеварение пристеночное 27, 67  
 Плазмодесмы 99  
 Пластиды 128, 129, 132  
 Пластинка  
 — плотная (ламина) 58, 193, 197,  
 198, 202—204  
 — поровая (annulate lamellae) 202  
 Плевромитоз 260, 261  
 Плектин 57, 60  
 Подоциты 67  
 Порины 63, 64, 117, 303  
 Портрет гена 231, 232  
 Посттрансляционная обработка бел-  
 ков 147  
 Поток дифференцирующихся мем-  
 бран 183, 184  
 Промежуточные филаменты см. Фиб-  
 риллы 10 нм  
 Пространство  
 — перинуклеарное 193—195  
 — периплазматическое 63, 64, 73, 74,  
 147, 167  
 — экзоплазматическое см. Экзоплаз-  
 матические мембраны  
 TW-Протеин 44  
 Протеинкиназа  
 — А 85  
 — С 85, 86  
 — р34, или cdc2, 248, 249  
 Протофибрилла  
 — актиновая 34  
 — миозиновая 38, 39  
 Профаза 242, 247, 252, 253, 256  
 Профилин 33, 49

«Раздевающая» АТФаза 306  
 Реаранжировка генов 287  
 Редактирование РНК 226, 227  
 Репликация ДНК 244—246  
 — асинхронная 245  
 — мультирепликонная 245  
 — унирепликонная 245  
 Репликон 245  
 Рецепторы  
 — асиалогликопротеиновые 189  
 — дигидропиридиновые 149  
 — интегриновые см. Интегрины  
 — клеточной адгезии 291  
 — лектиновые 81, 82  
 — ЛНП 90, 188, 189  
 — маннозо-6-фосфата 186  
 — окаймленных (опушенных) кла-  
 триновых пузырьков 90  
 — рианодиновые 149—151  
 — SRP 144, 145, 147, 148  
 — транслокации 54 кДа 125  
 Рецептосомы 189  
 Рибосомы 102—113, 115, 126, 131—  
 132, 143—145  
 Рибофорины I и II 145  
 Рибохарин 236  
 Рибулезо-1,5-бисфосфаткарбоксила-  
 за-оксигеназа 307, 308  
 «Розетки» хромосом 214  
 га РНК 227, 228, 232  
 мя РНК 223  
 га РНП 227  
 мя РНП 223, 224  
 Самосплайсинг см. Сплайсинг авто-  
 каталитический  
 Саркосомы 111  
 Сателлиты перичентриольные 255—  
 257  
 Сегрегация ядрышка см. Ядрышко  
 Сеть эндоплазматическая 142—152,  
 157—160, 162, 171, 180—184, 190,  
 308—310  
 — гладкая 142—152  
 — промежуточная 142, 148  
 — шероховатая 142—147  
 Сигнал удержания 190  
 — ядерной локализации 199—201  
 Сигнальная последовательность 144,  
 145  
 Синемин 57  
 Скаффолд хромосом 206, 251  
 Скелетные филаменты см. Фибриллы  
 10 нм  
 Скелет ядра см. Матрикс ядерный  
 Соединительный комплекс см. Ком-  
 плекс соединительный  
 Сопрягающие мембраны 132—138  
 Спазмин 59, 60



Спазмонеми 59  
 Спейсеры 230—234, 240, 241  
 — нетранскрибируемые 230, 240  
 — транскрибируемые 231  
 Спектрин 35, 40—44, 57, 82, 84  
 Сплайнсинг 221—225, 227, 241  
 — автокаталитический (самосплайнсинг) 223, 225, 227  
 — альтернативный 222, 223  
 Сплайнсосомы 223, 226  
 Стенка клеточная 62—64  
 — бактерий 62—64, 169  
 — — грациликнутых 62, 63, 169  
 — — фирмикнутых 62—64  
 — высших растений 67, 69, 70, 167  
 — грибов 69  
 Стимулируемая секреция 94, 187  
 Стресс-фибриллы, или нити натяжения 36  
 Супербид (нуклеомер) 213, 214  
 Сфинголипиды 23

Таксол 48  
 Таурин 304  
 Телолизосома 166  
 Телофаза 242, 253  
 Тензин 78, 80  
 Тентин 58  
 Тилакоиды 129—132, 135  
 Титин 61  
 Тонкие филаменты 59—61  
 Тонофибриллы 32  
 Топоизомеразы 246, 252  
 Трансдуцин 86  
 Транспорт  
 — активный 29  
 — пассивный 29  
 — трансмембранный 28  
 Транслокация белка 125, 131, 310  
 Трансплайнсинг 224, 225, 227  
 Трансферазы сиаловых кислот 160, 161  
 Трансцитоз 88, 89, 189  
 Триплеты микротрубочек 52, 53, 255  
 Трискелион 90, 91, 306, 307  
 Тропомиозин 41, 43, 36, 40  
 Тропонины 34, 45  
 Тубулин 45—47, 49, 51, 83, 91  
 — мембранный 49  
 Тубулин-динеиновая система 48, 50, 51, 54  
 Тубулярный ретикулум 149

Убиквитин 172, 173, 210, 219  
 Убихинон 117, 119, 130  
 Унитарная мембрана 20, 21, 176—178

Фаголизосома 165  
 Фагосома 165, 166

Фагоцитоз 87, 88  
 Фагоциты 168  
 Фаллоидин 36  
 Фенолоксидаза 169  
 Фенолы 169  
 Фибриллы  
 — актиновые *см.* Микрофибриллы  
 — 10 нм (скелетные или промежуточные филаменты) 54—58, 60, 79, 204  
 — перихроматиновые 228, 229  
 Фибриллярное гало 257  
 Фибриллярный центр ядрышка *см.* Ядрышко  
 Фибронектин 67, 76—80, 223  
 Филаггрин 57  
 Филамин 34, 40, 44  
 Филлоподия 74, 75  
 Фимбрин 43  
 Фитогемагглютинин (ФГА) *см.* Лектины

Фитостерол 24  
 Флагелла 72  
 Флагеллин 63, 72  
 Флиппазы 148  
 Флип-флоп 24  
 Фодрин 44, 95  
 Фосфатидилинозитол 23, 26  
 Фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат 85  
 Фосфоглицериды 23  
 Фосфолипиды 23, 24  
 Фрагмин 34  
 Фрагмопласт 254, 255  
 F<sub>1</sub>-Фактор (фактор Рэкера) 118, 120, 121, 128  
 F<sub>0</sub>-Фактор 120, 121

Хитин 67, 69  
 Хлоропласт 128—132, 135—141, 309  
 — геном 130—132  
 Холестерол (холестерин) 24, 93, 135, 188, 189  
 Хромомеры 208, 214, 217  
 Хромопласты *см.* Пластиды  
 Хромосомы  
 — интерфазные 207—216  
 — метафазные 249—251  
 — политенные 207, 208  
 — типа ламповых щеток 207, 208, 218, 219

Целлюлоза 67—71  
 Центриоль 252, 255—257  
 Центромера 249  
 Центросома 255  
 Циклины 248, 249  
 Циклический АМФ (цАМФ) 84, 85, 150, 151  
 — ГМФ (цГМФ) 86



Цикл лизосом  
— автофагический 166, 167  
— гетерофагический 166, 167  
Цистерна спасения 190  
Цитозоль 102, 103  
Цитотомия 39, 243, 252, 254, 272  
Цитохалазины 36, 88, 94, 95  
Цитохромоксидаза 118, 119  
Цитохромы 117—119, 130, 135, 139,  
149

— а—аз 117—118  
— b, b<sub>6</sub> 119  
— b<sub>563</sub>, b<sub>559</sub>, f<sub>557</sub> 130  
— b—c<sub>1</sub> 117—119  
— c 117—119  
— P<sub>450</sub> 149

ЦОМТ см. Микротрубочкоорганизу-  
ющий центр (МТОЦ)

Шапероны 309

Шапочка (кэп) 82, 83, 100

Шапочкообразование см. Кэппинг

Щелевые соединения 99, 100

Щеточная каемка 40, 44

Эдитосомы 226

Экзоны 221—225

Экзоплазматические мембраны (эк-  
зоэпимембраны) 177, 178, 184, 191

Экзоцитоз 39, 92—95

Эндоплазматические мембраны (эн-  
домембраны) 177, 178, 184, 191

Эндосомы 182, 189

Эндотоксины 169

Эндоцитоз 39, 87—89, 178, 179

— компенсаторный 178, 179

— опосредованный рецепторами 89

Ядрышко 233—238

— кольцевое 237

— компактное 237

— нуклеолонемное 237

— фибриллярный центр 234, 236

Ядрышковый компонент

— — гранулярный 234—237

— — фибриллярный 234—237

— организатор 230—235, 251



# ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	3
Глава 1. История и методология цитологических исследований	6
1.1. История развития цитологии	10
1.2. Методология и методы современной цитологии	15
1.3. Место общей цитологии в системе биологических наук	17
Глава 2. Поверхностный аппарат клеток и цитоскелет	19
2.1. Общая характеристика	31
2.2. Организация поверхностного аппарата и цитоскелета	61
2.2.1. Плазматическая мембрана	72
2.2.2. Субмембранная часть поверхностного аппарата и цитоскелет	87
2.2.3. Надмембранные структуры поверхностного аппарата	95
2.3. Единство систем поверхностного аппарата в реализации основных клеточных функций	102
2.3.1. Рецепторная функция	103
2.3.2. Транспорт в мембранной упаковке	113
2.3.3. Постоянные межклеточные контакты	128
Глава 3. Метаболический аппарат цитоплазмы	132
3.1. Общая характеристика	138
3.2. Организация рибосом	142
3.3. Органоиды энергетического обмена	152
3.3.1. Митохондрии	163
3.3.2. Пластиды	173
3.3.3. Сопрягающие мембраны	176
3.3.4. Биогенез энергообразующих органоидов	193
3.4. Мембранные органоиды метаболического и катаболического обменов	194
3.4.1. Эндоплазматическая сеть (эндоплазматический ретикулум)	197
3.4.2. Аппарат Гольджи	205
3.4.3. Лизосомы	207
3.4.4. Пероксисомы и другие мембранные органоиды	219
3.5. Морфофункциональная взаимосвязь основных мембранных органоидов анаболической и катаболической систем цитоплазмы	242
Глава 4. Ядерный аппарат	243
4.1. Общая характеристика	249
4.2. Поверхностный аппарат ядра	252
4.2.1. Ядерная оболочка	259
4.2.2. Поровые комплексы и плотная пластинка	278
4.3. Интерхроматиновый ядерный матрикс	312
4.4. Интерфазные хромосомы	314
4.5. Синтез и созревание РНК	
Глава 5. Репродукция клеток	
5.1. Общая характеристика	
5.2. Интерфазные периоды цикла репродукции эукариотных клеток	
5.3. Организация хромосом в типичном метазойном митозе	
5.4. Основные кинетические процессы митоза и организация митотического аппарата	
5.5. Эволюционное и сравнительно-цитологическое направление исследований	
Глава 6. Проявление единства организации клетки в ее жизнедеятельности	
Рекомендуемая литература	
Предметный указатель	



